

**PENGARUH PEMBERIAN KEFIR SUSU SAPI TERHADAP JUMLAH
LEUKOSIT SERUM DARAH TIKUS PUTIH (*Rattus novergicus*)
BUNTING YANG DIPAPAR ASAP ROKOK**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kebidanan**



Oleh:

Lisa Diana Putri

NIM: 145070601111042

**PROGRAM STUDI S1 KEBIDANAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

HALAMAN PENGESAHAN**TUGAS AKHIR****PENGARUH PEMBERIAN KEFIR SUSU SAPI TERHADAP JUMLAH
LEUKOSIT SERUM DARAH TIKUS PUTIH (*Rattus novergicus*) BUNTING
YANG DIPAPAR ASAP ROKOK**

Oleh:

Lisa Diana Putri
NIM 145070601111042

Telah diuji pada
Hari : Senin
Tanggal : 16 April 2018
dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I,

Dr.rer.nat.Triyudani MR,M.App.,SC
NIP. 197607232008122001

Pembimbing-I/Penguji-II,

Pembimbing-II/Penguji-III,

Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes
NIP. 195505121987012001

dr. Maya Devi Arifiandi, SpOG
NIP. 2016097902032001

Mengetahui,

Ketua Program Studi S1 Kebidanan

Linda Ratna Wati, SST, M.Kes
NIP. 198409132014042001

PENYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Lisa Diana Putri

NIM : 145070601111042

Program Studi: S1 Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya aku sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil plagiasi, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 23 Maret 2018

Yang membuat pernyataan,

(Lisa Diana Putri)

NIM. 145070601111042

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT atas segala kekuatan dan kemudahan yang telah diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian serta penyusunan tugas akhir yang berjudul “Pengaruh Pemberian Kefir Susu Sapi terhadap Jumlah Leukosit Serum Darah Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Bunting yang Dipapar Asap Rokok”.

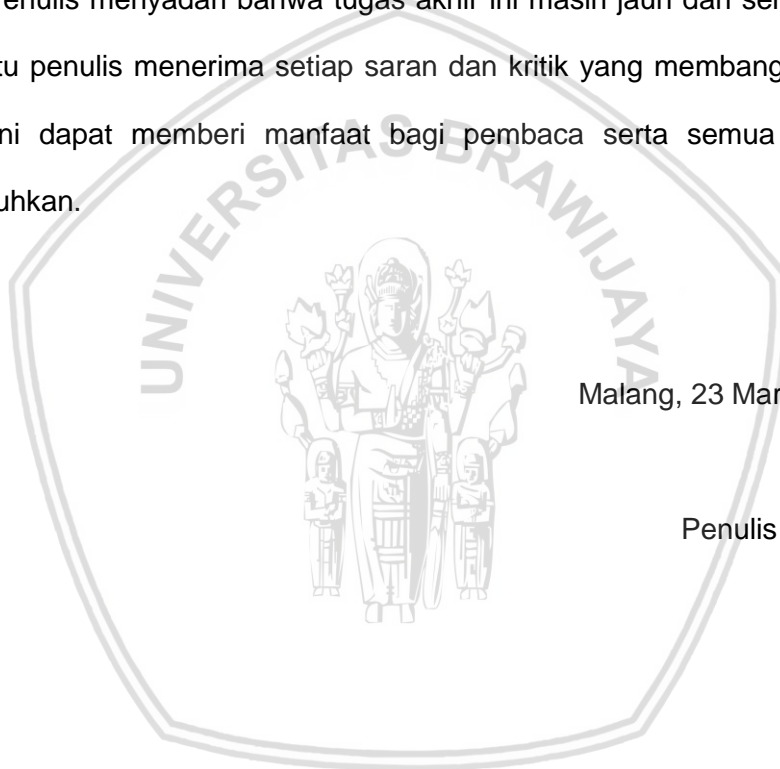
Ketertarikan penulis akan topik ini didasari oleh masih tingginya jumlah perokok baik perokok aktif maupun perokok pasif, dimana asap rokok dapat mengakibatkan berbagai macam efek yang merugikan, salah satunya yaitu terjadinya leukositosis yang memiliki berbagai dampak negatif terhadap kehamilan dan janin. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa kefir susu sapi sebagai antioksidan dapat menurunkan aktivitas radikal bebas sehingga dapat mencegah terjadinya leukositosis.

Dengan selesainya tugas akhir ini, penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes selaku dosen pembimbing I yang telah memberikan bimbingan, masukan dan saran sehingga tulisan ini dapat diselesaikan.
2. dr. Maya Devi Arifiandi, SpOG selaku pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, masukan dan saran sehingga tulisan ini dapat diselesaikan.
3. Dr.rer.nat.Triyudani MR,M.App.,SC selaku Ketua Tim Penguji Ujian Tugas Akhir yang telah memberikan bimbingan, masukan dan saran untuk menyempurnakan naskah Tugas Akhir.

4. Linda Ratna Wati, SST., M.Kes selaku Ketua Program Studi S1 Kebidanan yang telah membimbing penulis menuntut ilmu di Program Studi S1 Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
5. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan penulis kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Penulis menyadari bahwa tugas akhir ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis menerima setiap saran dan kritik yang membangun. Semoga tulisan ini dapat memberi manfaat bagi pembaca serta semua pihak yang membutuhkan.



Malang, 23 Maret 2018

Penulis

ABSTRAK

Putri, Diana Lisa. 2018. **Pengaruh Pemberian Kefir Susu Sapi terhadap Jumlah Leukosit Serum Darah Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Bunting yang dipapar Asap Rokok**. Tugas Akhir, Program Studi S1 Kebidanan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes (2) dr. Maya Devi Arifiandi, SpOG

Lingkungan yang buruk seperti paparan asap rokok sebagai radikal bebas akan meningkatkan ROS (Reactive Oxygen Species) dan menyebabkan stres oksidatif yang ditandai dengan reaksi inflamasi berupa peningkatan jumlah leukosit. Tingginya jumlah leukosit yang melebihi kadar normal pada wanita hamil, berakibat buruk pada kehamilan dan janin. Aktivitas radikal bebas dapat dicegah dan dihambat menggunakan antioksidan dari dalam maupun luar tubuh. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian kefir susu sapi terhadap jumlah leukosit serum darah tikus putih yang dipapar asap rokok. Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan rancangan penelitian *Randomized Post Test Only Control Group Design*. Sampel dibagi kedalam 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Kelompok kontrol negatif (-) adalah tikus bunting yang tidak dipapar asap rokok tanpa pemberian kefir susu sapi. Sedangkan Kelompok kontrol positif (+) adalah tikus bunting yang dipapar asap rokok tanpa pemberian kefir susu sapi. Kelompok perlakuan yaitu tikus bunting yang dipapar asap rokok dengan pemberian kefir susu sapi dengan 3 dosis berbeda (P1=2,5; P2=5; P3=10 ml/kgBB/hari) selama 14 hari. Variabel penelitian adalah jumlah leukosit serum darah. Hasil penelitian secara signifikan menunjukkan jumlah leukosit serum darah pada kontrol (+) yaitu $12,26 \times 10^3/\mu\text{L}$ lebih tinggi dibandingkan kontrol negatif (-) yaitu $7,22 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($p = 0,013$) ($p < 0,05$). Pada ketiga kelompok perlakuan (P1= $9,84 \times 10^3/\mu\text{L}$; P2= $8,5 \times 10^3/\mu\text{L}$; P3= $7,32 \times 10^3/\mu\text{L}$) menunjukkan jumlah leukosit serum darah yang lebih rendah dibandingkan kontrol (+), dimana P3 dapat mengembalikan leukosit serum darah ke kondisi normal (kontrol negatif). Kefir susu sapi terbukti dapat menurunkan jumlah leukosit serum darah tikus yang dipapar asap rokok.

Kata kunci: leukosit, kefir susu sapi, asap rokok, kehamilan

ABSTRACT

Putri, Diana Lisa. 2018. **Effect of Cow Milk Kefir on Total Leukocyte Count in Pregnant White Rat (*Rattus novergicus*) Exposed to Cigarette Smoke**. Final Assignment, Bachelor of Midwifery Program, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya. Supervisors : (1) Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes (2) dr. Maya Devi Arifiandi, SpOG

Bad environments such as exposure to cigarette's smoke as free radicals will increase ROS (Reactive Oxygen Species) and cause oxidative stress which is characterized by an inflammatory reaction could increases total leukocyte count. The high total of leukocyte that exceeds normal levels in pregnant women, adversely affects pregnancy and fetus. Free radical activity can be prevented and inhibited using antioxidants from within and outside the body. This study aims to know the effect of cow milk kefir on total leukocyte count in white rat exposed to cigarette smoke. This research is experimental using Randomized Post Test Only Control Group Design. Samples were divided into 2 control groups and 3 treatment groups. The negative control group (-) is a rat that is not exposed to cigarette smoke without giving kefir. whereas positive control group (+) is rat exposed to cigarette smoke without giving kefir. The treatment group was rat exposed to cigarette smoke by giving kefir with 3 different doses (P1 = 2.5, P2 = 5, P3 = 10 ml / kg BW / day) during 14 days. The research variable was total leukocyte count. The results showed significant total leukocyte count at control (+) ie $12,26 \times 10^3/\mu\text{L}$ higher than negative control (-) ie $7,22 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($p = 0,013$) ($p < 0.05$). Three treatment groups (P1= $9,84 \times 10^3/\mu\text{L}$; P2= $8,5 \times 10^3/\mu\text{L}$; P3= $7,32 \times 10^3/\mu\text{L}$) showed significantly lower total leukocyte count than control (+), where P3 can regulated leukocyte to normal (negative control). Kefir is proven to decreased total leukocyte count of rat exposed to cigarette smoke.

Keywords: leukocyte, kefir, cigarette smoke, pregnancy

DAFTAR ISI

Halaman

Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan	iii
Kata Pengantar	iv
Abstrak (Bahasa Indonesia)	vi
Abstrak (Bahasa Inggris)	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Tabel	xi
Daftar Gambar	xii
Daftar Lampiran	xiii
Daftar Singkatan	xiv

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Manfaat Akademik	4
1.4.2 Manfaat Praktis	4

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kefir	6
2.1.1 Starter Kefir	7
2.1.2 Kandungan Nutrisi Kefir	9
2.1.3 Proses Pembuatan Kefir	13
2.1.4 Peranan Kefir Susu Sapi terhadap Jumlah Leukosit	14
2.2 Antioksidan	15
2.3 Leukosit	17
2.3.1 Jenis-Jenis Leukosit	18
2.3.1.1 Granulosit (<i>Polymorphonuclear Leucocytes</i>)	18
2.3.1.1.1 Neutrofil	19
2.3.1.1.2 Eosinofil	19
2.3.1.1.3 Basofil	20
2.3.1.2 Agranulosit (<i>Mononuclear Leucocytes</i>)	20
2.3.1.2.1 Limfosit	21
2.3.1.2.2 Monosit	22
2.3.2 Leukositosis	23
2.4 Hewan Coba Tikus	25
2.4.1 Reproduksi Tikus	27
2.4.2 Kebuntingan Tikus	29

2.4.3 Hematologi Tikus	29
2.4.4 Pemantauan Keselamatan Tikus.....	30
2.5 Paparan Asap Rokok.....	30
2.6 Radikal Bebas	32

BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep	35
3.2 Hipotesis Penelitian	37

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian.....	38
4.2 Hewan Coba	38
4.2.1 Kriteria Inklusi	39
4.2.2 Kriteria Eksklusi	39
4.3 Besar Sampel dan Replikasi.....	39
4.4 Tempat dan Waktu Penelitian	40
4.5 Variabel Penelitian	40
4.5.1 Variabel Bebas.....	40
4.5.2 Variabel Tergantung	40
4.6 Definisi Operasional.....	40
4.7 Bahan dan Alat Penelitian.....	42
4.7.1 Bahan Penelitian.....	42
4.7.2 Alat Penelitian.....	43
4.8 Prosedur Penelitian	44
4.8.1 Aklimatisasi Hewan Coba	44
4.8.2 Prosedur Pembuntingan Hewan Coba	44
4.8.3 Pembagian Kelompok Hewan Coba.....	45
4.8.4 Penentuan Dosis Kefir Susu Sapi	46
4.8.5 Prosedur Pemeliharaan Hewan Coba	47
4.8.6 Prosedur Pemberian Kefir Susu Sapi pada Hewan Coba.....	47
4.8.7 Prosedur Pemaparan Asap Rokok pada Hewan Coba.....	47
4.8.8 Prosedur Pembedahan dan Pengambilan Jumlah Leukosit Serum Darah	48
4.8.9 Prosedur Pengukuran Jumlah Leukosit Serum Darah.....	49
4.9 Alur Penelitian	50
4.10 Analisis Data.....	51

BAB 5. HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian	53
5.2 Analisis Data.....	55

BAB 6. PEMBAHASAN

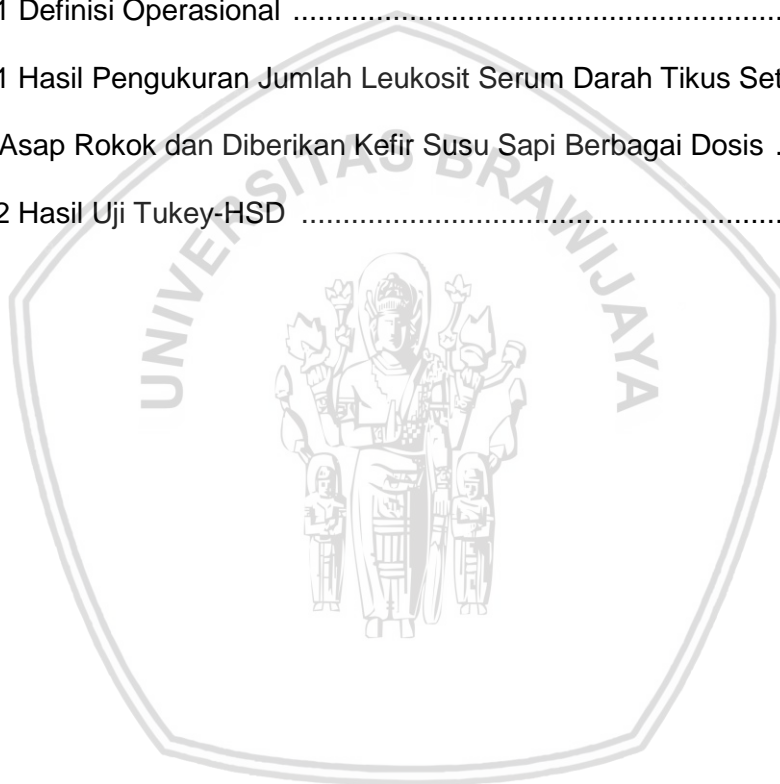
BAB 7. PENUTUP

7.1 Kesimpulan.....	63
7.2 Saran.....	63
Daftar Pustaka.....	65



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Kandungan Mikroflora pada Bibit Kefir	10
Tabel 2.2 Kandungan Kefir Susu Sapi	12
Tabel 2.3 Data Biologi Tikus	26
Tabel 4.1 Definisi Operasional	40
Tabel 5.1 Hasil Pengukuran Jumlah Leukosit Serum Darah Tikus Setelah Dipapar Asap Rokok dan Diberikan Kefir Susu Sapi Berbagai Dosis	53
Tabel 5.2 Hasil Uji Tukey-HSD	56



DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1 Granula Kefir	8
Gambar 2.2 Respon Inflamasi Lokal dan Sistemik Pengaruh Asap Rokok dan Partikel Asing	24
Gambar 2.3 Tikus Putih Galur Wistar (<i>Rattus novergicus</i>)	26
Gambar 4.1 <i>Smoking Pump</i>	43
Gambar 5.1 Grafik Rata-Rata Jumlah Leukosit Serum Darah Tikus	54



DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1. Surat Kelaikan Etik	70
Lampiran 2. Kandungan Makanan Hewan Coba	71
Lampiran 3. Hasil Tes Jumlah Leukosit Serum Darah Tikus (<i>Rattus novergicus</i>) Bunting	72
Lampiran 4. Pengawinan Tikus.....	74
Lampiran 5. Pemberian Kefir Susu Sapi dan Pengasapan Rokok.....	75
Lampiran 6. Pembedahan Hewan Coba	76
Lampiran 7. Hasil Uji Normalitas Data, Uji Homogenitas Varian dan Uji Anova .	77
Lampiran 8. Hasil uji Tukey-HSD	78
Lampiran 9. Hasil Uji Korelasi dan Regresi.....	80
Lampiran 10. Curriculum Vitae.....	81

DAFTAR SINGKATAN

ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
ALP	: <i>Alkalifosfatase</i>
ATP	: <i>Adenosina trifosfat</i>
CO ₂	: <i>Carbondioxide</i>
CCl ₄	: <i>Carbon Tetrachloride</i>
Cu	: <i>Cuprum</i>
DDT	: <i>Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DPPH	: <i>1,1 – diphenyl – 2 – picryhydrazil</i>
EDTA	: <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
EMP	: <i>Embden-Meyerhof Parnas</i>
ETS	: <i>Environtmental Tobacco Smoke</i>
Fe	: <i>Ferro</i>
FSH	: <i>Follicle Stimulating Hormone</i>
GATS	: <i>Global Adult Tobacco Survey</i>
GM-SCF	: <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
GSH	: <i>Glutathione Peroxidase</i>
H ⁺	: <i>Hidron</i>
H ₂ O ₂	: <i>Hidrogen peroksida</i>
HSD	: <i>Honestly Significance Diffirence</i>
I _κ B	: <i>Inhibitor of _κB</i>
IL-6	: <i>Interleukin 6</i>
IL-8	: <i>Interleukin 8</i>
IL-1β	: <i>Interleukin 1 beta</i>

INAD	: Infeksi Neonatal Awitan Dini
LH	: <i>Luteinizing Hormone</i>
MCH	: <i>Mean Corpuscular Hemoglobin</i>
MCHC	: <i>Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration</i>
MCV	: <i>Mean Corpuscular Volume</i>
Mn	: <i>Mangan</i>
NADH	: <i>Nikotinamida Adenosin Dinukleotida Hidrogen</i>
NADP	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor-KappaB</i>
OH	: <i>Hidroksi</i>
ONOO ⁻	: <i>Peroksinitrit</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
RO	: <i>Radikal Alkoksi</i>
ROO	: <i>Peroksil</i>
ROOH	: <i>Hidroperoksida</i>
ROOR	: <i>Peroksida</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
ROIs	: <i>Reactive Oxidative Intermediate's</i>
Se	: <i>Selenium</i>
SOD	: <i>Superoxide Dismutase</i>
SPSS	: <i>Statistical Package for the Social Science</i>
TPC	: <i>Total Plate Count</i>
UV	: <i>Ultraviolet</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>
Zn	: <i>Zinc</i>

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**PENGARUH PEMBERIAN KEFIR SUSU SAPI TERHADAP JUMLAH
LEUKOSIT SERUM DARAH TIKUS PUTIH (*Rattus novergicus*) BUNTING
YANG DIPAPAR ASAP ROKOK**

Oleh:

Lisa Diana Putri
NIM 145070601111042

Telah diuji pada
Hari : Senin
Tanggal : 16 April 2018
dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I,


Dr. rer. nat. Triyudani MR, M.App., SC
NIP. 196611051993032001

Pembimbing-I/Penguji-II,

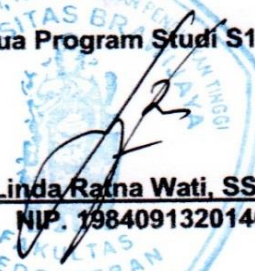

Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes
NIP. 195505121987012001

Pembimbing-II/Penguji-III,


dr. Maya Devi Arifiandi, SpOG
NIP. 2016097902032001

Mengetahui,

Ketua Program Studi S1 Kebidanan


Linda Ratna Wati, SST, M.Kes
NIP. 198409132014042001

ABSTRAK

Putri, Diana Lisa. 2018. **Pengaruh Pemberian Kefir Susu Sapi terhadap Jumlah Leukosit Serum Darah Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Bunting yang dipapar Asap Rokok**. Tugas Akhir, Program Studi S1 Kebidanan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes (2) dr. Maya Devi Arifiandi, SpOG

Lingkungan yang buruk seperti paparan asap rokok sebagai radikal bebas akan meningkatkan ROS (Reactive Oxygen Species) dan menyebabkan stres oksidatif yang ditandai dengan reaksi inflamasi berupa peningkatan jumlah leukosit. Tingginya jumlah leukosit yang melebihi kadar normal pada wanita hamil, berakibat buruk pada kehamilan dan janin. Aktivitas radikal bebas dapat dicegah dan dihambat menggunakan antioksidan dari dalam maupun luar tubuh. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian kefir susu sapi terhadap jumlah leukosit serum darah tikus putih yang dipapar asap rokok. Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan rancangan penelitian *Randomized Post Test Only Control Group Design*. Sampel dibagi kedalam 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Kelompok kontrol negatif (-) adalah tikus bunting yang tidak dipapar asap rokok tanpa pemberian kefir susu sapi. Sedangkan Kelompok kontrol positif (+) adalah tikus bunting yang dipapar asap rokok tanpa pemberian kefir susu sapi. Kelompok perlakuan yaitu tikus bunting yang dipapar asap rokok dengan pemberian kefir susu sapi dengan 3 dosis berbeda (P1=2,5; P2=5; P3=10 ml/kgBB/hari) selama 14 hari. Variabel penelitian adalah jumlah leukosit serum darah. Hasil penelitian secara signifikan menunjukkan jumlah leukosit serum darah pada kontrol (+) yaitu $12,26 \times 10^3/\mu\text{L}$ lebih tinggi dibandingkan kontrol negatif (-) yaitu $7,22 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($p = 0,013$) ($p < 0,05$). Pada ketiga kelompok perlakuan (P1= $9,84 \times 10^3/\mu\text{L}$; P2= $8,5 \times 10^3/\mu\text{L}$; P3= $7,32 \times 10^3/\mu\text{L}$) menunjukkan jumlah leukosit serum darah yang lebih rendah dibandingkan kontrol (+), dimana P3 dapat mengembalikan leukosit serum darah ke kondisi normal (kontrol negatif). Kefir susu sapi terbukti dapat menurunkan jumlah leukosit serum darah tikus yang dipapar asap rokok.

Kata kunci: leukosit, kefir susu sapi, asap rokok, kehamilan

ABSTRACT

Putri, Diana Lisa. 2018. **Effect of Cow Milk Kefir on Total Leukocyte Count in Pregnant White Rat (*Rattus novergicus*) Exposed to Cigarette Smoke**. Final Assignment, Bachelor of Midwifery Program, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya. Supervisors : (1) Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes (2) dr. Maya Devi Arifiandi, SpOG

Bad environments such as exposure to cigarette's smoke as free radicals will increase ROS (Reactive Oxygen Species) and cause oxidative stress which is characterized by an inflammatory reaction could increases total leukocyte count. The high total of leukocyte that exceeds normal levels in pregnant women, adversely affects pregnancy and fetus. Free radical activity can be prevented and inhibited using antioxidants from within and outside the body. This study aims to know the effect of cow milk kefir on total leukocyte count in white rat exposed to cigarette smoke. This research is experimental using Randomized Post Test Only Control Group Design. Samples were divided into 2 control groups and 3 treatment groups. The negative control group (-) is a rat that is not exposed to cigarette smoke without giving kefir. whereas positive control group (+) is rat exposed to cigarette smoke without giving kefir. The treatment group was rat exposed to cigarette smoke by giving kefir with 3 different doses (P1 = 2.5, P2 = 5, P3 = 10 ml / kg BW / day) during 14 days. The research variable was total leukocyte count. The results showed significant total leukocyte count at control (+) ie $12,26 \times 10^3/\mu\text{L}$ higher than negative control (-) ie $7,22 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($p = 0,013$) ($p < 0.05$). Three treatment groups (P1= $9,84 \times 10^3/\mu\text{L}$; P2= $8,5 \times 10^3/\mu\text{L}$; P3= $7,32 \times 10^3/\mu\text{L}$) showed significantly lower total leukocyte count than control (+), where P3 can regulated leukocyte to normal (negative control). Kefir is proven to decreased total leukocyte count of rat exposed to cigarette smoke.

Keywords: leukocyte, kefir, cigarette smoke, pregnancy

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Bagi sebagian masyarakat Indonesia, merokok merupakan suatu fenomena umum. Sehingga setiap tahunnya, orang-orang yang terpapar asap rokok ikut menyumbangkan prevalensi yang besar. Data dari *Global Adult Tobacco Survey* (GATS) prevalensi orang dewasa yang terpapar asap rokok (perokok pasif) di tempat kerja terdapat 51,3% atau sekitar 14,6 juta, 42,4% diantaranya adalah perempuan. Perempuan yang terpapar asap rokok di rumah sebesar 78,4%, 76,2% terpapar di restoran, 62,4% pada angkutan umum, 55,4% di gedung-gedung pemerintah atau kantor dan 16,5% pada fasilitas kesehatan. Dari prevalensi tersebut, tidak menutup kemungkinan ada perempuan hamil di antaranya. Perempuan hamil yang terus menerus terpapar asap rokok dapat mengalami efek negatif yang hampir sama tingkatannya dengan perempuan hamil perokok aktif. Perempuan hamil yang terpapar asap rokok menyalurkan zat-zat beracun dari asap rokok kepada janin yang dikandungnya melalui peredaran darah (GATS, 2011).

Asap rokok yang dihasilkan mengandung lebih dari 4.000 jenis bahan kimia, antara lain nikotin, karbon monoksida, tar, DDT (pestisida), arsenik, *cadmium*, *formaldehyde*, *hydrogen cyanide*, *naphthalene*, *polonium-210*, *vinyl chloride* dan jenis bahan kimia lainnya (Depkes, 2009). Selain itu, asap rokok juga mengandung banyak senyawa oksidan yang dapat meningkatkan produksi radikal bebas. Adanya peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Species*) akibat

paparan asap rokok diimbangi dengan sistem pertahanan antioksidan. Akan tetapi pada saat level ROS meningkat melebihi sistem pertahanan antioksidan, terjadilah stres oksidatif. Stres oksidatif ditandai dengan adanya reaksi inflamasi berupa peningkatan jumlah leukosit, neutrofil darah perifer dan kadar *alkalifosfatase* (ALP) (Komala, 2011).

Stres oksidatif juga berperan penting dalam patofisiologi berbagai penyakit. Stres oksidatif yang muncul akibat paparan asap rokok dihubungkan dengan peningkatan jumlah sitokin dalam tubuh seperti interleukin (IL)-8, interleukin (IL)-6, IL-1 β , dan *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF). Sitokin tersebut masing-masing menstimulasi sumsum tulang dan menjadi mediator terjadinya inflamasi sistemik. IL-8 merupakan sitokin yang berperan terhadap leukositosis akibat paparan asap rokok. IL-8 diproduksi sel leukosit dan non-leukosit. Diantara sel tersebut, neutrofil memproduksi IL-8 dalam jumlah yang sangat kecil, namun saat terstimulasi oleh nikotin, neutrofil akan memproduksi IL-8 dalam jumlah yang besar dan merupakan penyebab leukositosis (Cunningham, 2013).

Leukositosis pada wanita hamil merupakan peningkatan jumlah leukosit yang melebihi kadar normal di dalam darah. Di masa kehamilan, sebagai kompensasi mengandung janin terjadi peningkatan fisiologis dari leukosit. Efek ini terjadi akibat toleransi ibu terhadap antigen jaringan asing dari janin yang bersifat semialogenik (genetik 50% dari paternal dan 50% dari maternal sehingga janin akan mempresentasikan antigen yang terdapat pada paternal dan maternal). Namun, jika jumlah sel darah putih lebih dari 12.000 sel/mm³ merupakan indikasi adanya leukositosis pada wanita hamil. Tingginya jumlah

leukosit berakibat buruk pada kehamilan dan janin, seperti persalinan prematur, Infeksi Neonatal Awitan Dini (INAD), dan lain-lain (Ross, 2011).

Kefir susu sapi merupakan kefir susu yang dibuat dari susu sapi ditambahkan starter kefir berupa granula kefir atau biji kefir. Kefir lebih encer dari *yoghurt*, namun gumpalan susunya lebih lembut dan mengandung gas CO₂. Kefir susu sapi dapat dikonsumsi sebagai minuman kesehatan yang berkhasiat menyembuhkan berbagai penyakit. Kefir susu sapi berperan sebagai antioksidan, bermanfaat menghentikan proses oksidasi dengan menetralkan radikal bebas yang terbentuk selama oksidasi, menurunkan resiko terjadinya stress oksidatif yang akan mempengaruhi jumlah leukosit. Selain itu, dapat menjaga keseimbangan mikroflora dalam usus, mampu mengontrol dan menghilangkan bakteri patogen dalam tubuh, mengontrol kadar kolesterol dengan cara melindungi dari kerusakan kardiovaskuler, mengurangi resiko kanker atau tumor pada saluran pencernaan dan organ vital lainnya, menyembuhkan penyakit seperti migrain, diare, serta menangkal radikal bebas (Liu, 2005).

Peneliti ingin mengetahui apakah ada pengaruh pemberian kefir susu sapi terhadap jumlah total leukosit serum darah tikus yang dipapar asap rokok.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ada pengaruh pemberian kefir susu sapi terhadap jumlah leukosit serum darah tikus putih yang dipapar asap rokok?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui apakah ada pengaruh pemberian kefir susu sapi terhadap jumlah leukosit serum darah tikus putih yang dipapar asap rokok.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengukur jumlah leukosit pada serum darah tikus putih yang dipapar asap rokok.
2. Mengukur jumlah leukosit pada serum darah tikus putih yang dipapar asap rokok dan diberi kefir susu sapi.
3. Mengetahui kadar kefir susu sapi yang dapat memberikan efek optimal terhadap penurunan leukosit pada serum darah tikus putih yang dipapar asap rokok.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Memberikan sumbangan ilmu pengetahuan khususnya di bidang kesehatan, yaitu informasi baru mengenai sumber antioksidan yaitu kefir susu sapi, untuk mencegah stres oksidatif yang disebabkan oleh asap rokok, serta sebagai bahan referensi untuk penelitian selanjutnya.

1.4.2 Manfaat Praktis

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi alternatif solusi di masyarakat, yakni kefir susu sapi sebagai antioksidan guna penurunan resiko terhadap penyakit-penyakit yang disebabkan oleh asap rokok. Yang mana, kefir susu sapi

dapat dikembangkan lebih pesat dalam hal produk minuman kesehatan untuk segala kalangan usia. Selain itu dapat pula diciptakan jenis makanan atau minuman baru yang mengandung kefir susu sapi sehingga dapat meningkatkan mutu pangan.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kefir

Kefir adalah susu fermentasi yang memiliki rasa, warna dan konsistensi yang menyerupai yoghurt dan memiliki aroma khas *yeasty* (seperti tape). Kefir diperoleh melalui proses fermentasi susu pasteurisasi menggunakan starter berupa butir atau biji kefir (*kefirgrain/ kefirgranule*), yaitu butiran-butiran putih atau krem dari kumpulan bakteri, antara lain *Streptococcus sp.*, *Lactobacilli* dan beberapa jenis ragi khamir nonpatogen. Bakteri berperan menghasilkan asam laktat dan komponen flavor, sedangkan ragi menghasilkan gas asam arang atau karbon dioksida dan sedikit alkohol. Itulah sebabnya rasa kefir asam dan juga ada sedikit rasa alkohol dan soda, dan kombinasi karbon dioksida dan alkohol menghasilkan buih yang menciptakan karakter mendesis pada produk (Usmiati, 2007).

Kefir merupakan produk fermentasi susu yang mempunyai karakteristik yang khas, yaitu campuran rasa asam, alkoholik, dan karbonat yang dihasilkan dari proses fermentasi bakteri dan khamir. Pada prinsipnya proses pembuatan kefir sama dengan proses pembuatan yoghurt. Dengan penambahan granul kefir sampai 5% dan diperam selama 18-24 jam pada suhu 22°C maka akan dihasilkan produk minuman kefir dengan pH < 4,65, kandungan asam laktat 0,6-0,8% dan kadar alkohol bervariasi antara 0,5-1% (Hidayat *et al.*, 2006).

Mikroorganisme yang ada dalam starter kefir menghasilkan asam dan alkohol oleh bakteri asam laktat dan khamir yang hidup bersimbiosis dan tumbuh

dalam granula kefir. Granula kefir berbentuk seperti kembang kol berwarna putih atau kekuningan, diameter granula antara 2-15 mm dengan berat beberapa gram. Setelah fermentasi selesai, granula kefir didapatkan kembali melalui penyaringan. Dari metabolisme pentosa selama fermentasi, bakteri kelompok homofermentatif menghasilkan asam laktat hampir 90% dan sedikit asam asetat, sedangkan dari metabolisme heksosa bakteri heterofermentatif memproduksi asam laktat, CO₂, dan etanol, dan menghasilkan komponen flavor susu fermentasi diasetil dan asetaldehid (Sudono *et al.*, 2004).

Kefir memiliki kadar asam laktat 0,8-1%, alkohol 0,5-2,5%, CO₂, kelompok vitamin B dan rasio diasetil-asetaldehid 3,1. Komposisi dan kadar nutrisi kefir adalah air 89,5%, lemak 1,5%, protein 3,5%, abu 0,6%, laktosa 4,5%, dan pH 4,6. Komponen dan komposisi kimia kefir bervariasi, bergantung pada jenis mikrobial starter, suhu, lama fermentasi, serta bahan baku yang digunakan. Bahan baku susu yang berkadar lemak tinggi menghasilkan kefir dengan kadar lemak yang tinggi, dan sebaliknya penggunaan susu skim menghasilkan kefir dengan kadar lemak yang rendah. Banyak sedikitnya asam laktat dan alkohol dalam kefir sangat dipengaruhi oleh kadar laktosa bahan baku, jenis mikrobial starter, dan lama fermentasi (Usmiati, 2007).

2.1.1 Starter Kefir

Kultur starter kefir disebut butiran kefir, mengandung mikroba yang terdiri dari bakteri dan khamir yang masing-masing berperan dalam pembentukan cita rasa dan struktur kefir. Bakteri menyebabkan terjadinya asam sedangkan khamir menghasilkan alkohol dan CO₂ pada proses fermentasi. Hal ini membedakan rasa yoghurt dan kefir. Komposisi mikroba dalam butiran kefir dapat bervariasi

sehingga hasil akhir kefir kadang mempunyai aroma yang bervariasi. Spesies mikroorganisme dalam bibit kefir di antaranya *Lactococcus acidophilus*, *L. kefir*, *L. kefirgranum*, dan *L. parakefir* yang berfungsi dalam pembentukan asam laktat dari laktosa. *Lactobacillus kefiranofaciens* sebagai pembentuk lendir (matriks butiran kefir), *Leuconostoc sp.* Membentuk diasetil dari sitrat, dan *Candida kefir* pembentuk etanol dan karbon dioksida dari laktosa. Selain itu juga ditemukan *L. brevis* dan khamir jenis *Torulopsis holmii* dan *Saccharomyces delbrueckii* (Hidayat *et al.*, 2006).



Gambar 2.1 Granula Kefir (Leite *et al.*, 2013)

Bakteri asam laktat dan khamir yang hidup bersimbiosis dan tumbuh di dalam biji kefir berada dalam perbandingan yang seimbang. Bakteri asam laktat yang berbentuk batang akan menempati lapisan perifer (luar) biji, sedangkan ragi ada di dalam intinya. Biji kefir yang diinokulasikan ke dalam susu akan mengembang (diameternya membesar) dan warnanya menjadi kecoklatan

karena diselubungi partikel-partikel susu. Kefir yang dihasilkan juga dapat digunakan kembali sebagai inokulum. Kefir yang dihasilkan juga dapat dijadikan sebagai starter untuk membuat kefir berikutnya dengan menambahkan 3-5% kefir ke dalam susu pasteurisasi. Aktivasi biji kefir kering sebelum digunakan sebagai starter perlu dilakukan dengan cara merendam biji kefir dalam susu steril selama beberapa jam dengan konsentrasi 10-12% berat/volume pada suhu ruang sampai mengembang, dilakukan tiga kali seminggu (Usmiati, 2007).

Starter kefir tidak dapat dikeringkan dengan pemanasan karena sebagian mikroorganisme di dalamnya akan mati. Bibit kefir masih aktif jika diawetkan dengan cara pengeringan beku (*freeze drying*). Tapi cara terbaik menyimpan bibit kefir adalah dengan memindahkan bibit kefir lama ke dalam susu yang dipasteurisasi secara berkala, diinkubasi semalam dan disimpan dalam lemari es bersuhu 4-7°C. Dalam kondisi seperti ini bibit kefir tetap aktif selama kurang lebih sebulan (Hidayat *et al.*, 2006).

2.1.2 Kandungan Nutrisi Kefir

Kandungan nutrisi dari kefir sesungguhnya bervariasi, dan ditentukan oleh konsentrasi dari lemak dalam susu, keaslian bibit kefir yang digunakan, dan durasi serta temperatur dari fermentasi, dan sebaik apa kondisi penyimpanannya. Ketika kefir siap untuk dikonsumsi, maka minuman itu mengandung laktat, format, propionat, dan asam suksinat, CO₂ (*Carbon dioxide*), entanol, aldehid, sedikit aseton dan aldehid isoamil dan bermacam-macam folat (Guven dan Gulmez, 2003).

Mikroflora yang dominan pada bibit kefir tercantum dalam tabel di bawah ini dan juga terdiri dari mesofilik, homofermentatif dan laktokokus

heterofermentatif, laktobasilus heterofermentatif, fermentasi laktosa dan ragi nonfermentasi laktosa dan bakteri asam asetat sedangkan untuk ekologi kuman yang terkandung di dalam bibit kefir tergantung pada keaslinan dan metode pengolahan dari bibit kefir tersebut (Hui *et al.*, 2004).

Tabel 2.1 Kandungan Mikroflora pada Bibit Kefir (Farnworth, 2005)

	Species
Yeast	<i>Brettanomyces anomalus</i> <i>Candida friedrichii</i> <i>Candida holmii</i> <i>Candida inconspicua</i> <i>Candida kefir</i> <i>Candida lambica</i> <i>Candida maris</i> <i>Candida pseudotropicalis</i> <i>Candida tannotelerans</i> <i>Candida tenuis</i> <i>Candida valida</i> <i>Issatchenkia occidentalis</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Pichia fermentans</i> <i>Saccharomyces carlbergensis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces dairensis</i> <i>Saccharomyces delbrueckii</i> <i>Saccharomyces exiguus</i> <i>Saccharomyces turicensis</i> <i>Saccharomyces unisporus</i> <i>Saccharomyces sp.</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i>
Bacteria	Acetic acid bacteria <i>Acetobacter acetii</i> <i>Acetobacter pasteurianus</i> <i>Acetobacter sp.</i> Enterococci <i>Enterococcus durans</i> Lactobacilli <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus fructivorans</i> <i>Lactobacillus helveticus</i>

Lactobacillus hilgardii
Lactobacillus kefir
Lactobacillus kefiranoferiens
Lactobacillus kefirgranum
Lactobacillus paracasei
Lactobacillus parakefir
Lactobacillus plantarum
Lactobacillus rhamnosus
Lactobacillus viridescens

Lactococci

Lactococcus lactis subsp. *cremoris*
Lactococcus lactis subsp. *Lactis*

Leuconostocs

Leuconostoc mesenteroides
Leuconostoc sp.

Streptococci

Streptococcus thermophiles

Other bacteria

Bacillus sp.
Bacillus subtilis
Escherichia coli
Micrococcus sp.

Kandungan asam laktat pada kefir yaitu sekitar 0,8% dan kadar alkoholnya sekitar 1,0% dengan karbon dioksida sebagai fermentasi utama dengan produk kefir (Park dan George, 2013). Kandungan dalam kefir tersebut memiliki kandungan yang sama dengan susu, seperti protein, lemak dan mineralnya, sehingga kefir dapat dengan mudah dicerna dan tidak mengakibatkan masalah pencernaan walaupun dikonsumsi dalam jumlah besar (Farnworth, 2005). Selama fermentasi, protein menjadi mudah dicerna dikarenakan aksi dari koagulasi asam amino dan proteolisis, dimana tidak terdapat perbedaan profil antara susu kefir dan kefir yang digunakan sebagai media kultur, namun, tingkat amonia, serin, lisin, alanin, treonin, triptofan, valin, metionin, fenilalanin dan isoleusin lebih tinggi pada kefir dibandingkan dengan susu yang difermentasi. Selama proses fermentasi juga, laktosa dari susu akan terdegradasi menjadi asam yang menyebabkan pengurangan pH dan

peningkatan konsistensinya. Dimana terdapat sekitar 30% dari susu laktosa yang dihidrolisis oleh enzim β -galaktosidase, yang mengubah laktosa menjadi glukosa dan galaktosa. Glukosa akan diubah menjadi asam laktat oleh bakteri yang terdapat dalam kefir (Seydim *et al.*, 2003; Kevicius dan Sarkinas, 2004). Kandungan lipid (mono-, di-, dan tri-gliserida, asam lemak bebas dan steroid) pada kefir dapat bervariasi tergantung pada jenis susu apa yang digunakan dalam fermentasi. Dalam susu fermentasi, kemunculan asam lemak bebas akan memberikan kontribusi terhadap peningkatan pencernaan (Otlés dan Özlem, 2003)

Selain itu, kandungan antioksidan dan asam folat dalam kefir meningkat jika dibandingkan dengan susu. Kandungan protein pada kefir lebih mudah dicerna dan mengandung asam amino triptofan yang memiliki efek menenangkan saraf (relaksasi). Efek penenang kefir pada sistem saraf dapat bermanfaat dalam mengatasi masalah insomnia, stres, depresi dan ADHD (*Attention Deficit Hyperactive Disorder*) (Ide, 2008).

Tabel 2.2 Kandungan Kefir Susu Sapi

	Hari ke-1	Hari ke-5
TPC	$3,8 \times 10^7$ kol/gr	$2,6 \times 10^7$ kol/gr
Protein	4,88%	4,91%

Sumber: Balai Penelitian dan Konsultasi Industri Laboratorium, 2017

2.1.3 Proses Pembuatan Kefir

Kefir biasanya dibuat menggunakan proses tradisional dan proses industri. Proses industri yang digunakan sekarang yaitu dengan teknik yang modern untuk menghasilkan kefir dengan karakteristik yang sama yang ditemukan pada proses tradisional. Kefir dapat dibuat dari bermacam-macam tipe susu seperti susu kambing, sapi, domba, kelapa, beras, atau kedelai. Adapun macam-macam pilihan susu yang digunakan yaitu susu pasteurisasi, nonpasteurisasi, susu utuh, susu rendah lemak, susu skim dan susu tanpa lemak (Otes *et al.*, 2003).

Secara tradisional proses pembuatan kefir dilakukan dengan cara memanaskan susu (pasteurisasi) kemudian didinginkan sampai 18-22°C. Butiran kefir disebarkan setinggi 5-10 cm pada dasar tangki fermentasi atau fermentor kemudian susu ditambahkan sebanyak 20-30 kali jumlah butiran kefir. Proses fermentasi berlangsung selama 18-24 jam pada suhu 18-22°C. Selama proses fermentasi dilakukan pengadukan 2-3 kali. Setelah diperoleh kualitas kefir yang dikehendaki, selanjutnya dilakukan penyaringan untuk memisahkan butiran kefir. Butiran kefir ini dibilas dengan air dan dapat digunakan untuk proses pembuatan kefir berikutnya. Untuk membuat kefir yang siap untuk diminum, maka kefir hasil fermentasi (setelah dipisahkan dari kefir grain), ditambah susu segar sebanyak 8-10 kali, dihomogenisasi, dimasukkan ke dalam kontainer, difermentasi lagi selama 1-3 hari pada suhu 18-22°C. Selama proses pemeraman ini akan terjadi pembentukan asam laktat, alkohol, CO₂ dan senyawa-senyawa yang menghasilkan flavor dan aroma (Hidayat *et al.*, 2006).

Langkah-langkah pembuatan kefir adalah susu segar dipasteurisasi atau dipanaskan pada suhu 85-90°C selama 30 menit, kemudian didinginkan sampai

mencapai suhu kamar ($\pm 28^{\circ}\text{C}$), kemudian dimasukkan 3% butir-butir kefir dan diaduk merata. Diinkubasi selama 20-24 jam pada suhu kamar agar proses fermentasi berlangsung. Bila susu sudah menggumpal lalu disaring dengan menggunakan saringan plastik untuk mendapatkan butir-butir kefir kembali. Kefir yang sudah disaring siap untuk diminum. Butir-butir kefir yang diperoleh dicuci dengan air matang dingin untuk dipakai lagi pada waktu lain (Usmiati, 2007).

2.1.4 Peranan Kefir Susu Sapi terhadap Jumlah Leukosit

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa leukositosis (peningkatan jumlah leukosit) pada perokok disebabkan oleh peningkatan kadar radikal bebas (Komala, 2011). Peningkatan radikal bebas akan menyebabkan peningkatan ROS. ROS akan menyebabkan terjadinya ketidakseimbangan oksidan dan antioksidan pada perokok yang mengakibatkan stres oksidatif sistemik (Moriarty *et al.*, 2003).

Stres oksidatif tersebut dapat menyebabkan terjadinya inflamasi sistemik, yang ditandai oleh stimulasi dari sistem hematopoetik, khususnya sumsum tulang dalam menghasilkan dan mengeluarkan leukosit dan platelet pada sirkulasi. Beberapa studi menunjukkan bahwa merokok dalam jangka panjang meningkatkan jumlah total leukosit (Smith *et al.*, 2003).

Antioksidan dalam kefir susu sapi dapat mencegah terbentuknya radikal bebas dalam tubuh. Guven *et al* (2003), dalam penelitiannya menyebutkan bahwa kefir memiliki efek antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan vitamin E pada tes toksisitas dengan CCl_4 (Carbon Tetrachloride) pada tikus (Guyen *et al*, 2003).

Efek aktifitas antioksidatif pun ditemukan oleh Liu *et al* (2005), yang mengevaluasi aktifitas antioksidatif dari kefir susu sapi dan susu kambing. Dilaporkan bahwa kemampuan kefir untuk mengikat radikal 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) dan radikal superoksida pun bagus, sebagai tambahan untuk menghambat peroksidasi asam linolat, dimana susu kefir menunjukkan kemampuan substansi donor proton yang lebih dibandingkan dengan susu biasa, sehingga kefir dapat menjadi perlindungan untuk melawan proton radikal bebas. Penangkapan proton radikal bebas merupakan mekanisme yang penting untuk antioksidan. Kefir mengandung antioksidan potensial terutama peptida yang diperoleh dari protein susu yang berinteraksi dengan berbagai spesies yang secara langsung bertanggung jawab terhadap kerusakan oksidatif, meskipun mekanismenya masih belum dapat dimengerti. Aktifitas antioksidan lainnya yaitu dapat menghambat peroksidasi lemak, dimana kefir menunjukkan aktifitas antioksidatif yang tinggi melalui efek menghambat peroksidasi lemak (Liu *et al*, 2005).

2.2 Antioksidan

Antioksidan merupakan sebutan untuk zat yang berfungsi melindungi tubuh dari serangan radikal bebas. Yang termasuk ke dalam golongan zat ini antara lain vitamin, polipenol, karoten, dan mineral. Secara alami, zat ini sangat besar peranannya pada manusia untuk mencegah terjadinya penyakit. Antioksidan melakukan semua itu dengan cara menekan kerusakan sel yang terjadi akibat proses oksidasi radikal bebas (Fitria, 2010). Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari

pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif (Murray *et al.*, 2003).

Sumber antioksidan dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok, yaitu antioksidan alami (antioksidan hasil ekstraksi bahan alami) dan antioksidan sintetik (antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesis reaksi kimia). Antioksidan alami di dalam makanan dapat berasal dari:

- (a) Senyawa antioksidan yang sudah ada dari satu atau dua komponen makanan,
- (b) Senyawa antioksidan yang terbentuk dari reaksi-reaksi selama proses pengolahan,
- (c) Senyawa antioksidan yang diisolasi dari sumber alami dan ditambahkan ke makanan sebagai bahan tambahan pangan (Pazil, 2009).

Antioksidan dapat berupa enzim (misalnya superoksida dismutase atau SOD, katalase, dan glutathion peroksidase), vitamin (misalnya vitamin E, vitamin C, vitamin A, dan β -karoten), dan senyawa lain (misalnya flavonoid, albumin, bilirubin, seloplasmin, dan lain-lain). Antioksidan enzimatis merupakan sistem pertahanan utama (primer) terhadap kondisi stres oksidatif. Enzim-enzim tersebut merupakan metaloenzim yang aktivitasnya sangat bergantung pada adanya ion logam, dimana SOD bergantung pada logam Fe, Cu, Zn, dan Mn, katalase bergantung pada logam Fe, dan *glutathion* bergantung pada Se (selenium). Antioksidan enzimatis bekerja dengan cara mencegah terbentuknya senyawa radikal bebas baru (Winarsi, 2007).

2.3 Leukosit

Leukosit berwarna bening (tidak berwarna), bentuknya lebih besar dari sel darah merah, tetapi jumlahnya lebih kecil (Pearce, 2008). Leukosit adalah sel darah yang mengandung inti, disebut juga sel darah putih. Di dalam darah manusia, normal didapati jumlah leukosit rata-rata $5.000-9.000 \text{ sel/mm}^3$, bila jumlahnya lebih dari 12.000 sel/mm^3 , keadaan ini disebut leukositosis, bila kurang dari 5.000 sel/mm^3 disebut leukopenia (Guyton, 2011).

Selama kehamilan, sebagai kompensasi mengandung janin terjadi peningkatan fisiologis dari leukosit sekitar $5.000-12.000 \text{ sel/mm}^3$. Efek ini terjadi akibat toleransi ibu terhadap antigen jaringan asing dari janin yang bersifat semialogenik. Namun, jika jumlah sel darah putih lebih dari 12.000 sel/mm^3 merupakan indikasi adanya leukositosis pada wanita hamil (Ross, 2011).

Dilihat dalam mikroskop cahaya, sel darah putih yang tidak mempunyai granula disebut leukosit agranulosit, sitoplasmanya homogen dengan inti bentuk bulat atau bentuk ginjal. Terdapat dua jenis leukosit agranulosit, yaitu limfosit sel kecil, sitoplasma sedikit dan monosit sel agak besar, mengandung sitoplasma lebih banyak. Sedangkan sel darah putih yang mempunyai granula spesifik (granulosit), berupa tetesan setengah cair dalam sitoplasmanya dan mempunyai bentuk inti yang bervariasi. Terdapat tiga jenis leukosit granulosit, yaitu neutrofil, basofil, dan asidofil (atau eosinofil) yang dapat dibedakan dengan afinitas granula terhadap zat warna netral basa dan asam. Granula dianggap spesifik bila ia secara tetap terdapat dalam jenis leukosit tertentu dan pada sebagian besar *precursor* (pra zatnya) (Effendi, 2003).

Leukosit merupakan unit yang aktif dari sistem peredaran tubuh. Leukosit ini sebagian besar diproduksi di sumsum tulang (granulosit, monosit, dan sedikit

limfosit) dan sebagian lagi di jaringan limfe (limfosit dan sel-sel plasma). Setelah dibentuk, sel-sel ini diangkut dalam darah menuju berbagai bagian tubuh untuk digunakan. Manfaat sesungguhnya dari sel darah putih ialah kebanyakan ditranspor ke daerah yang terinfeksi dan mengalami peradangan serius (Guyton, 2003).

Terdapat enam macam sel darah putih yang secara normal ditemukan di dalam darah. Keenam sel tersebut adalah netrofil polimorfonuklear, basofil polimorfonuklear, eosinofil polimorfonuklear, monosit, limfosit dan terkadang sel plasma. Ketiga tipe pertama dari sel yaitu sel-sel polimorfonuklear, seluruhnya memiliki gambaran granular, sehingga sel-sel tersebut disebut granulosit (Guyton, 2003).

Pada manusia dewasa, leukosit dapat dijumpai sekitar 7.000 sel per mikroliter darah. Biasanya presentasi normal dari sel darah putih yaitu neutrofil polimorfonuklir 62%, eosinofil polimorfonuklir 2,3%, basofil polimorfonuklir 0,4%, monosit 5,3%, dan limfosit 30%. Dan untuk parameter presentasi normal hitung jenis sel darah putih yaitu neutrofil polimorfonuklir 50-70% (absolut 2.500-7.000 sel/mm³), eosinofil polimorfonuklir 1-3% (absolut 50-300 sel/mm³), basofil polimorfonuklir 0-1% (absolut 20-100 sel/mm³), monosit 4-6% (absolut 200-600 sel/mm³), dan limfosit 25-35% (absolut 200-600 sel/mm³) (Guyton, 2003).

2.3.1 Jenis-Jenis Leukosit

2.3.1.1 Granulosit (*Polymorphonuclear Leucocytes*)

Leukosit ditandai dengan kehadiran butiran dalam sitoplasma bila dilihat di bawah mikroskop cahaya. Ada tiga jenis granulosit yang dinamai sesuai dengan sifat pewarnaan, yaitu:

2.3.1.1.1 Neutrofil

Neutrofil merupakan sel darah putih terbanyak yang terkandung dalam tubuh manusia, jumlahnya mencapai 50-70%. Neutrofil memiliki inti sel lebih dari dua dan bentuk granulnya kecil dan halus. Granulosit neutrofil memiliki diameter rata-rata 12-15 mikrometer (μm) dalam darah perifer. Neutrofil mewarnai dirinya dengan pewarna netral, atau campuran pewarna asam dan basa, dan tampak berwarna ungu (Pearce, 2008).

Neutrofil berhubungan dengan pertahanan tubuh terhadap infeksi bakteri dan jamur serta proses peradangan kecil lainnya. Aktivitas dan matinya neutrofil dalam jumlah yang banyak menyebabkan adanya nanah. Neutrofil pada manusia dan hewan menunjukkan perbedaan berdasarkan sintesis protein, ekspresi reseptor, metabolisme oksidatif, fungsi dan pewarnaan sitokimia. Neutrofil yang cacat dapat dilihat dari jumlah maupun bentuknya. Bentuk maupun jumlahnya berpotensi untuk menjelaskan tingkat infeksi (Feldman, 2012).

2.3.1.1.2 Eosinofil

Eosinofil berhubungan dengan infeksi parasit, dimana saat terjadi peningkatan eosinofil menandakan banyaknya parasit. Granulosit eosinofil berdiameter 9 μm dan memiliki 2-4 lobus. Granulanya berwarna merah dengan pewarnaan asam, ukuran dan bentuknya hampir sama dengan neutrofil, tetapi granula dalam sitoplasmanya lebih besar, banyaknya kira-kira 1-3% (Nugraha, 2015).

Fungsi utama eosinofil adalah detoksifikasi baik terhadap protein asing yang masuk dalam tubuh melalui paru-paru ataupun saluran cerna maupun racun yang dihasilkan oleh bakteri dan parasit. Sel ini sangat penting dalam

respon terhadap penyakit parasitik dan alergi (Hoffbrand, 2005). Eosinofil juga berperan dalam perbaikan jaringan, kekebalan bawaan, dapatan dan adaptif. Eosinofil banyak ditemukan di medula, pertemuan antara korteks dan medial dari timus dalam saluran pencernaan bagian bawah, ovarium, rahim, limpa, dan kelenjar getah bening, tapi tidak dalam paru-paru, kulit, kerongkongan, atau beberapa organ internal lainnya dalam kondisi normal (Schalm, 2010).

2.3.1.1.3 Basofil

Basofil memiliki granula berwarna biru dengan pewarnaan basa, sel ini lebih kecil daripada eosinofil, tetapi mempunyai inti yang bentuknya teratur, di dalam protoplasmanya terdapat granula-granula yang besar, banyaknya kira-kira 0-1% di sumsum merah ((Nugraha, 2015).

Setiap sel pada jaringan, memiliki banyak karakteristik yang serupa yaitu peka terhadap histamin, suatu zat kimia yang disekresi oleh sel-sel jika dirangsang dengan cara tertentu. Histamin menyebabkan beberapa gejala reaksi alergi. Basofil dapat keluar dari darah ke jaringan bila diperlukan, dimana bertanggung jawab untuk alergi dan antigen respons dengan melepaskan histamine kimia yang menyebabkan peradangan. Selain itu, basofil juga mengandung antikoagulan heparin, yang mencegah penggumpalan darah terlalu cepat ((Nugraha, 2015).

2.3.1.2 Agranulosit (*Mononuclear Leucocytes*)

Leukosit ditandai oleh ketiadaan jelas butiran dalam sitoplasma, ukurannya kurang lebih 12-15 mikron. Sel yang termasuk di dalamnya, antara lain limfosit dan monosit (Nugraha, 2015).

2.3.1.2.1 Limfosit

Limfosit adalah jenis leukosit kedua paling banyak setelah neutrofil (20-40% dari total leukosit). Jumlah limfosit ini akan meningkat bila terjadi infeksi virus. Berdasarkan fungsinya limfosit dibagi atas limfosit B dan limfosit T. Limfosit B matang pada sumsum tulang sedangkan limfosit T matang dalam timus. Keduanya tidak dapat dibedakan dalam pewarnaan Giemsa karena memiliki morfologi yang sama dengan bentuk bulat dengan ukuran 12 μm . Sitoplasma sedikit karena semua bagian sel hampir ditutupi nukleus padat dan tidak bergranula. Limfosit B berasal dari sel stem di dalam sumsum tulang dan tumbuh menjadi sel plasma, yang menghasilkan antibodi. Limfosit T terbentuk jika sel stem dari sumsum tulang pindah ke kelenjar thymus yang akan mengalami pembelahan dan pematangan. Di dalam kelenjar thymus, limfosit T belajar membedakan mana benda asing dan mana bukan benda asing. Limfosit T dewasa meninggalkan kelenjar thymus dan masuk ke dalam pembuluh getah bening dan berfungsi sebagai bagian dari sistem pengawasan kekebalan (Nugraha, 2015).

Berdasarkan ukurannya limfosit dibedakan menjadi beberapa jenis:

- a. *Resting lymphocyte*: biasanya berukuran kecil (7-10 μm), inti selnya berbentuk bulat atau oval.
- b. *Reactive ("activical") lymphocyte*: berukuran paling besar bila terjadi infeksi misalnya mono nukleosis.
- c. *Large granula lymphocyte*: berukuran sedang mengandung granula kasar azurofilik, berperan sebagai sel *natural killer* (NK) imunologi (Kiswari, 2015).

Ukuran sel limfosit beragam, ada yang seperti eritrosit dan ada yang sebesar netrofil. Limfosit dengan garis tengah 6-8 mikrometer dikenal sebagai limfosit kecil. Sitoplasma limfosit bersifat basa lemah dan berwarna biru muda pada sediaan yang terpulas. Sitoplasma ini mengandung granula azurofilik. Inti selnya kebanyakan bulat atau terkadang mirip ginjal. Kromatin inti amat padat dan berwarna biru gelap. Sel ini juga relative sedikit dan berwarna biru langit tanpa granula spesifik, namun pada beberapa sel terlihat granula azurofil yang jika pulasannya baik berwarna ungu kemerahan (Nugraha, 2015).

2.3.1.2.2 Monosit

Monosit dibentuk di dalam sumsum tulang, masuk ke dalam sirkulasi dalam bentuk imatur. Di area terjadinya cedera atau infeksi monosit meninggalkan darah dan mengalami proses pematangan menjadi makrofag setelah masuk ke jaringan. Makrofag dapat tetap tersimpan di dalam jaringan atau digunakan dalam reaksi peradangan segera setelah sel ini matang (Corwin, 2008).

Jumlah monosit kira-kira 3-8% dari total jumlah leukosit. Monosit memiliki dua fungsi yaitu sebagai fagosit mikroorganisme (khususnya jamur dan bakteri) serta berperan dalam reaksi imun (Kiswari, 2014).

Monosit merupakan sel leukosit yang memiliki ukuran paling besar yaitu sekitar 18 μm , berinti padat dan melekung seperti ginjal atau biji kacang, sitoplasma tidak mengandung granula dengan masa hidup 20-40 jam dalam sirkulasi. Monosit terdapat dalam darah, jaringan ikan dan rongga tubuh. Monosit tergolong fagositik mononuclear (system retikuloendotel) dan mempunyai tempat-tempat reseptor pada permukaan membrannya (Effendi, 2003).

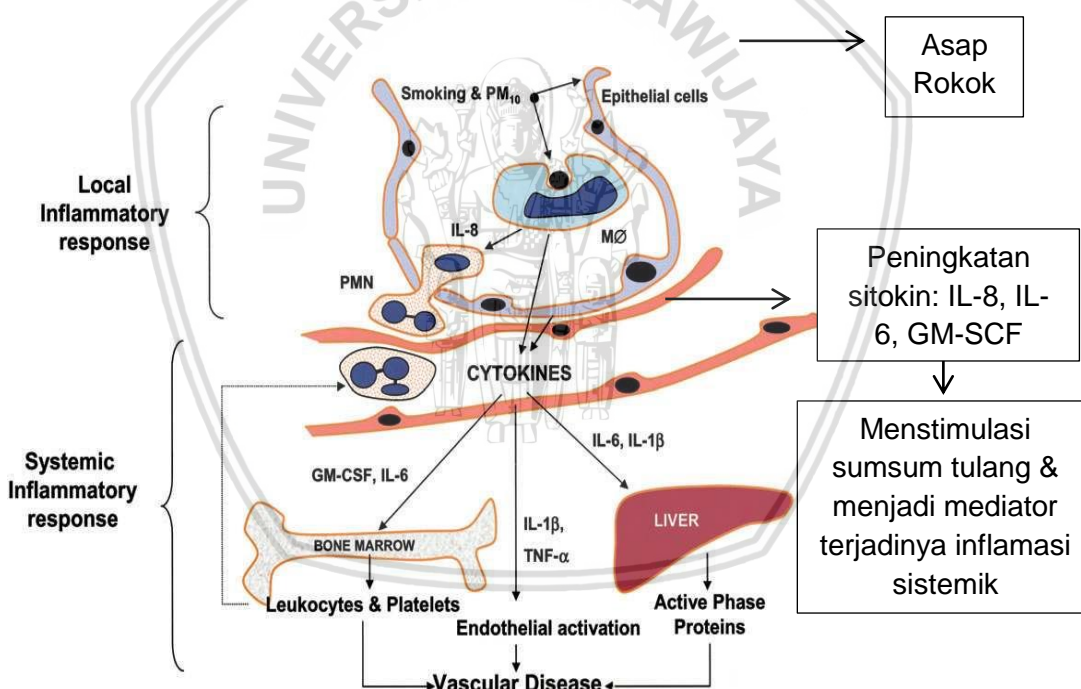
2.3.2 Leukositosis

Leukositosis adalah peningkatan jumlah leukosit pada darah perifer. Peningkatan jumlah total leukosit dapat disebabkan oleh banyak faktor, antara lain: kebiasaan merokok, anemia, tumor sumsum tulang, penyakit infeksi, inflamasi (seperti *rheumatid arthritis* dan alergi), leukemia, stres, *tissue damage* (seperti luka bakar) dan berat badan (Dinauer MC, 2000).

Paparan asap rokok menghasilkan kenaikan jumlah leukosit perifer 20-25% dibandingkan dengan orang yang tidak merokok. Asap rokok yang dihirup atau partikel ambien diproses oleh makrofag alveolar dan sel epitel paru. Sel-sel ini menghasilkan mediator proinflamasi seperti sitokin yang memicu terjadinya respon inflamasi lokal di paru-paru. Mediator inflamasi ini juga mentranslokasi ke sirkulasi dan menginduksi respons inflamasi sistemik. Respon ini termasuk stimulasi sumsum untuk melepaskan leukosit dan trombosit (Van Eeden *et al.*, 2005).

Peningkatan jumlah sitokin dalam tubuh sebagai mediator proinflamasi seperti Interleukin 8 (IL-8), Interleukin (IL-6), IL-1 β , dan *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) yang juga disebut dengan *Colony-Stimulating Factors* (CSFs) diuji dengan kemampuannya untuk menstimuli pertumbuhan dan perkembangan berbagai leukosit dan eritroid dari sel marrow. Bertanggung jawab terhadap stimulasi sumsum tulang yang diinduksi oleh inflamasi pada paru dan menjadi mediator terjadinya inflamasi sistemik (Abbas *et al.*, 2010). IL-6 adalah mediator penting respon fase akut dan berpotensi menstimulasi sumsum tulang untuk mengeluarkan leukosit dan platelet (Suwa *et al.*, 2000). IL-8 juga merupakan sitokin yang berperan terhadap leukositosis pada paparan asap rokok. IL-8 diproduksi oleh sel leukosit dan non-leukosit. Diantara sel tersebut,


neutrofil memproduksi IL-8 dalam jumlah yang sangat kecil, namun saat terstimulasi nikotin yang terkandung dalam asap rokok neutrofil memproduksi IL-8 dalam jumlah yang besar (Cunningham, 2013). Nikotin menginduksi *reactive oxidative intermediate's* (ROIs), terutama ONOO^- yang menjadi inisiator aktivasi $\text{NF-}\kappa\text{B}$ melalui peningkatan degradasi $\text{I}\kappa\text{B}$ sehingga produksi IL-8 meningkat pada leukosit (Komala, 2011). Tingginya jumlah leukosit berakibat buruk pada kehamilan dan janin, seperti persalinan prematur, Infeksi Neonatal Awitan Dini (INAD), dan lain-lain (Ross, 2011).



Gambar 2.2 Respon inflamasi lokal dan sistemik pengaruh asap rokok dan partikel asing (Van Eeeden *et al.*, 2005).

2.4. Hewan Coba Tikus

Hewan coba yang digunakan adalah tikus (*Rattus novergicus*) yang dipelihara. Tikus merupakan hewan laboratorium yang sering digunakan dalam berbagai macam penelitian karena telah diketahui sifat-sifatnya, mudah dipelihara, cepat berkembang biak, mudah ditangani, memiliki gen homolog dengan manusia, karakter anatomi dan fisiologi telah diketahui secara baik (Hubrecht dan Kirkwood, 2010). Klasifikasi ilmiah tikus (*Rattus novergicus*) galur Wistar adalah sebagai berikut (Russel *et al.*, 2008):



Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Family	: Muridae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus novergicus</i>

Tabel 2.3 Data Biologi Tikus

No.	Kondisi Biologi	Jumlah
1.	Berat badan: - jantan	300-400 g
	- betina	250-300 g
2.	Lama hidup	2,5–3 tahun
3.	Temperatur tubuh	37,5 °C
4.	Kebutuhan: - air	8-11 ml/100g BB
	- makanan	5g/100g BB
5.	Pubertas	50-60 hari
6.	Lama kebuntingan	21-23 hari
7.	Tekanan darah: - sistolik	84-184 mmHg
	- diastolik	58-145 mmHg
8.	Frekuensi: - jantung	330-480/menit
	- respirasi	66-114/menit
9.	Tidal volume	0,6-1,25mm

(Russel *et al.*, 2008)



Gambar 2.3 Tikus putih galur wistar (*Rattus norvegicus*)
(Hedrich, 2006)

2.4.1 Reproduksi Tikus

Tikus putih (*Rattus novergicus*) betina adalah mamalia yang memiliki waktu kawin pada masa estrus. Siklus estrus adalah suatu kegiatan fisiologik hewan betina dengan ciri-ciri khusus yang ditandai dengan keinginan untuk kawin. Siklus etrus berlangsung sekitar 4-5 hari dan segera sesudah beranak (*post-partum* estrus). Untuk mengetahui tahapan pada siklus estrus, dilakukan ulas vagina atau *papsmear*. Berdasarkan histologi vagina, siklus estrus pada tikus dibagi menjadi empat fase yaitu: a) proestrus, b) estrus, c) metestrus, dan d) diestrus (Samsuria, 2009).

Fase proestrus merupakan fase persiapan, yaitu fase yang mendahului estrus dan berlangsung selama 12 jam. Pada fase ini terjadi involusi fungsional corpus luteum serta pembengkakan praovulasi folikel. Folikel ovary yang tumbuh penuh (matur) akan meningkatkan sekresi estrogen di dalam darah. Pengaruh dari estrogen akan meningkatkan pertumbuhan uterus dan frekuensi mitosis endometrium selama fase folikuler. Pada fase ini gambaran epitel vagina didominasi oleh sel-sel epitel berinti, yang muncul secara tunggal atau berbentuk lapisan (Hayatin, 2007).

Fase estrus merupakan periode birahi dan keinginan untuk kopulasi (betina bersedia menerima pejantan untuk kawin) dimungkinkan hanya pada saat ini. Setiap siklus berlangsung selama 12 jam dan estrus dimulai pada malam hari. Kondisi ini berakhir 9 sampai 15 jam di bawah pengaruh FSH. Pada fase ini folikel ovary tumbuh dengan cepat dan terjadi sekresi estrogen yang tinggi. Estrus juga terjadi saat fase folikuler. Uterus mengalami pembesaran progresif dan menjadi bengkak karena akumulasi cairan lumen. Cairan yang terkumpul di dalam uterus menyebabkan uterus menjadi kontraktil. Mukosa vagina mengalami

banyak mitosis dalam pembentukan sel-sel baru. Penimbunan sel-sel tersebut pada lapisan permukaan menjadi squamosa dan menanduk. Sel-sel menanduk ini terkelupas ke dalam lumen vagina pada saat pemeriksaan preparat ulas vagina dan dipakai sebagai petunjuk estrus. Menjelang estrus berakhir di dalam lumen vagina terdapat massa seperti keju yang terdiri atas sel-sel menanduk dengan inti berdegenerasi, namun ditemukan sedikit saja leukosit. Ovulasi terjadi selama estrus dan didahului oleh perubahan histologik di dalam folikel yang menunjukkan adanya luteinisasi awal. Banyak cairan lumen yang hilang sebelum ovulasi. Apabila terjadi kebuntingan, siklus terganggu selama masa gestasi (Pardede, 2007).

Fase metestrus merupakan kelanjutan dari fase estrus dan berlangsung selama 6-15 jam. Fase ini ditandai dengan tumbuhnya sel-sel granulosa folikel dengan cepat yang dipengaruhi oleh *luteinizing hormone* (LH) dari adenohypophysis. Fase metestrus dapat diketahui dengan adanya dominasi sel-sel tanduk dan sel-sel leukosit jika dilihat dengan menggunakan metode ulas vagina (Pardede, 2007).

Fase diestrus merupakan fase terpanjang diantara fase-fase siklus estrus lainnya. Fase diestrus berlangsung selama 60-70 jam. Pada fase ini kontraksi uterus menurun, endometrium menebal dan kelenjar-kelenjar mengalami hipertropi, serta mukosa vagina menipis, warna lebih pucat dan leukosit yang bermigrasi semakin banyak. Gambaran ulas vagina pada fase ini menunjukkan leukosit dalam jumlah yang banyak (Hayatin, 2007).

2.4.2 Kebuntingan Tikus

Kebuntingan tikus putih terjadi selama 21-22 hari. Dalam kontrol pencahayaan (14 jam terang:10 jam gelap), 37% tikus lahir di siang hari ke-21, 20% tikus lahir selama malam hari pada hari ke-21 menuju hari ke-22 dan 42% tikus lahir di siang hari pada hari ke-22. Puncak kelahiran terjadi pada pukul 13.00-15.00 pada hari ke-21 dan 9.00-11.00 pada hari ke 22 (Krinke, 2000).

Kebuntingan tikus putih dapat dibuat dengan mengawinkan tikus betina dan tikus jantan. Untuk mengawinkan, tikus jantan dimasukkan ke kandang tikus betina yang sudah cukup umur dan ditinggal semalaman. Apusan vagina dapat dilakukan pada keesokan paginya. Apusan akan mengandung sejumlah sperma jika kopulasi telah terjadi. Selain itu, dapat juga ditemukan sumbat vagina pada tikus betina yang telah kawin. Sumbat ini berupa air mani yang menjendal berwarna kekuningan berasal dari sekresi kelenjar khusus tikus jantan dan sebagai penetapan awal kebuntingan (Krinke, 2000).

Tikus memiliki jumlah anak yang banyak per kelahiran (6-12 ekor), dengan berat lahir antara 5-6 gram, dan memiliki kecepatan tumbuh 5 gram/hari (Smith, 1988).

2.4.3 Hematologi Tikus

Volume total darah pada tikus adalah 50-70 mL/KgBB atau rata-rata yaitu 64 mL/KgBB (Krinke, 2000). Nilai hematologi tikus jantan adalah: eritrosit 6,85-8,53 juta/ μ l; leukosit 7,475-11.700 μ l; hemoglobin 12,48-14,63 g/dl; trombosit 561,750-948,000 μ l. Sedangkan pada tikus betina: eritrosit 6,72-7,76 juta/ μ l; leukosit 5,300-10,280 μ l; hemoglobin 12,48-14,58 g/dl dan trombosit 317,400-860.000 μ l (Sulaksono, 2002).

2.4.4 Pemantauan Keselamatan Tikus

Tikus sebagai hewan coba harus diperhatikan pada saat penggunaan, yaitu kandang tikus harus kuat, tidak mudah rusak, mudah dibersihkan, mudah dipasang lagi, tahan terhadap gigitan tikus, sehingga hewan tidak mudah lepas. Selain itu, kandang mudah dibersihkan dan hewan tampak jelas dari luar. Alas tempat tidur menggunakan sekam yang mudah menyerap air. Suhu, kelembaban dan pertukaran udara di dalam kandang harus baik. Setiap hari kandang dibersihkan dan alas tidur diganti, tangan perawat harus selalu bersih ketika merawat tikus, memperhatikan bila muncul gejala sakit seperti berat badan turun, sukar bernapas ataupun mencret (Ngatidjan, 2006).

2.5 Paparan Asap Rokok

Rokok adalah benda beracun yang memberi efek santai dan sugesti merasa lebih tenang. Di balik kegunaan atau manfaat rokok yang sedikit itu terkandung bahaya yang sangat besar bagi orang yang merokok maupun orang di sekitar perokok yang bukan perokok. Dimana paparan asap rokok terbagi dua, yakni: utama dan sampingan. Asap rokok yang dihisap ke dalam paru-paru oleh perokoknya disebut asap rokok utama (*main stream smoke*) atau disebut perokok aktif, sedang asap yang berasal dari ujung rokok yang terbakar disebut asap rokok sampingan (*side stream smoke*) atau perokoknya disebut perokok pasif. Asap rokok sampingan merupakan asap yang tiga kali lebih berbahaya dari asap rokok utama yang dihisap oleh perokok (Depkes, 2011). Lebih lanjut, WHO mendefinisikan perokok pasif sebagai orang yang tidak merokok yang terpapar *Environmental Tobacco Smoke* (ETS) minimal 15 menit perhari, termasuk ibu hamil. Belum tegasnya larangan merokok di tempat-tempat tertentu

menyebabkan ibu hamil tidak bisa terhindar dari paparan asap rokok (perokok pasif) (WHO, 2011).

Asap rokok dibagi menjadi dua fase, yaitu:

- a. Fase tar (ukuran partikel $>0,1 \mu\text{m}$), memiliki kandungan $>10^{17}$ radikal bebas/g, dan $>10^{15}$ radikal bebas/g. Fase tar terdiri dari nikotin, nitrosamine, N nitrosonorkotin, polisiklik hidrokarbon, logam berat dan karsinogenik amin. Radikal bebas dari fase tar memiliki waktu paruh lebih lama (beberapa jam sampai bulan).
- b. Fase gas pada asap rokok hanya memiliki waktu paruh beberapa detik, terdiri dari karbonmonoksida, karbondioksida, benzene, ammonia, formaldehid, hidrosianida, dan lain-lain (Smith *et al.*, 2001).

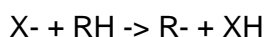
Asap rokok mengandung molekul radikal bebas sebanyak 10^{18} molekul radikal bebas per satu hisapan, berbagai bahan kimia, tar, asbestos, H_2O_2 , dan lainnya (Suhartono *et al.*, 2007). Peningkatan senyawa radikal bebas pada perokok dapat disebabkan oleh molekul dalam asap rokok seperti tar dan gas, aktivasi makrofag dan neutrofil, dan senyawa radikal oksigen endogen yang terbentuk saat reaksi rantai pernafasan dalam mitokondria (Pearson *et al.*, 2003). Asap rokok mengakibatkan stres oksidatif yang ditandai dengan meningkatnya radikal oksidan dan reaksi inflamasi, salah satunya berupa peningkatan jumlah leukosit (Brounwald *et al.*, 2002). Tingginya jumlah leukosit akan berakibat buruk pada kehamilan dan janin, seperti persalinan prematur, infeksi neonatal awitan dini (INAD), dan lain-lain (Ross, 2011).

2.6 Radikal Bebas

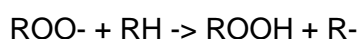
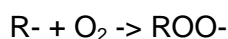
Radikal bebas merupakan salah satu bentuk senyawa oksigen reaktif, yang secara umum diketahui sebagai senyawa yang memiliki elektron yang tidak berpasangan. Senyawa ini terbentuk di dalam tubuh, dipicu oleh bermacam-macam faktor. Radikal bebas dapat terbentuk melalui proses metabolisme sel normal, peradangan, kekurangan gizi, dan akibat respons terhadap pengaruh dari luar tubuh, seperti polusi lingkungan, ultraviolet (UV), asap rokok, dan lain-lain. Senyawa radikal bebas yang terbentuk, seperti anion peroksida, hidroksil, hidrogen peroksida (H_2O_2), ozon, dan lain-lain. Senyawa-senyawa tersebut sering diistilahkan sebagai Senyawa Oksigen Reaktif (ROS), atau *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Winarsi, 2007).

Mekanisme terbentuknya radikal bebas dapat dimulai oleh banyak hal, baik yang bersifat endogen maupun eksogen. Reaksi selanjutnya adalah peroksidasi membran lipid dan sitosol yang mengakibatkan terjadinya serangkaian reduksi asam lemak sehingga terjadi kerusakan membran dan organel sel. Peroksidasi (otoksidasi) lipid bertanggung jawab tidak hanya pada kerusakan makanan, tapi juga menyebabkan kerusakan jaringan *in vivo* karena dapat menyebabkan kanker, inflamasi arteriosklerosis, dan penuaan. Efek yang merusak ini, dianggap terjadi akibat radikal bebas (ROO , RO , dan OH) yang dihasilkan saat pembentukan peroksida dari asam lemak dengan ikatan rangkap terselingi gugus metilen, yaitu ikatan yang ditemukan dalam asam lemak tak jenuh ganda yang terdapat di alam. Peroksidasi lipid merupakan reaksi berantai yang terus menghasilkan radikal bebas sehingga terjadi peroksidasi berikutnya. Tahapan reaksi pembentukan radikal bebas, melalui tiga tahapan reaksi berikut:

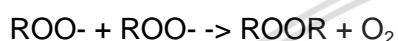
a. Inisiasi



b. Propagasi



c. Terminasi



Radikal bebas memiliki reaktivitas yang sangat tinggi, tidak stabil dan berumur sangat singkat, sehingga keberadaanya sulit dideteksi. Karena reaktivitasnya, senyawa radikal bebas akan sesegara mungkin menyerang komponen seluler yang berada disekelilingnya, baik berupa senyawa lipid, lipoprotein, protein, karbohidrat, ribonucleic acid (RNA), maupun deoxyribonucleic acid (DNA). Akibat lebih jauh dari reaktivitas radikal bebas adalah terjadinya kerusakan struktur maupun fungsi sel. Namun, demikian, reaktivitas radikal bebas dapat dihambat melalui tiga cara berikut.

- Mencegah atau menghambat pembentukan radikal bebas baru.
- Menginaktivasi atau menangkap radikal dan memotong propagansi (pemutusan rantai).
- Memperbaiki (repair) kerusakan oleh radikal (Winarsi, 2007).

Efek dari radikal bebas dalam tubuh tersebut akan dinetralisir oleh antioksidan yang dibentuk oleh tubuh sendiri dan asupan dari luar melalui makanan, minuman, atau obat-obatan, dan lain-lain (Anggraini, 2011).

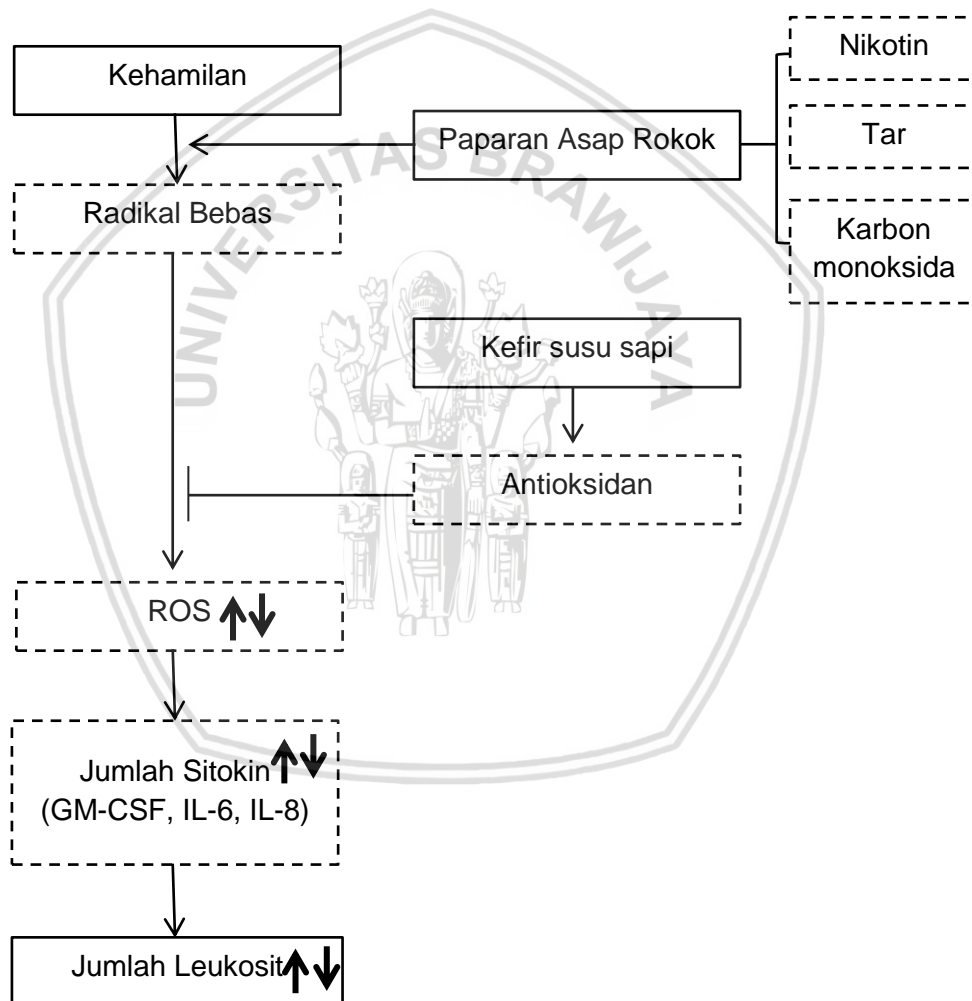
Di samping itu, ada juga antioksidan non enzimatis, yang disebut juga antioksidan sekunder karena dapat diperoleh dari asupan bahan makanan, seperti flavonoid, vitamin E, vitamin C, vitamin A, β -karoten dan lainnya. Senyawa ini berfungsi menangkap senyawa oksidan serta mencegah terjadinya reaksi berantai (Winarsi, 2007).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan:

↑ = sebelum intervensi

↓ = sesudah intervensi

— = variabel yang diteliti

----- = variabel yang tidak diteliti

|— = menghambat

Paparan asap rokok akan menghasilkan radikal bebas yang akan meningkatkan ROS (*Reactive Oxygen Species*) dalam tubuh. Meningkatnya ROS dalam tubuh diakibatkan kurangnya antioksidan yang dapat menghambatnya. Peningkatan ROS dalam tubuh ini akan meningkatkan jumlah sitokin dalam tubuh, seperti GM-CSF, IL-6 dan IL-8. Peningkatan sitokin ini berperan dalam peningkatan jumlah leukosit yang dapat menyebabkan terjadinya inflamasi dan leukositosis (Suwa *et al.*, 2000). Sitokin-sitokin tersebut juga disebut dengan *Colony-Stimulating Factors* (CSFs) dengan kemampuannya untuk menstimuli pertumbuhan dan perkembangan berbagai leukosit dan eritroid dari sel marrow. Bertanggung jawab terhadap stimulasi sumsum tulang yang diinduksi oleh inflamasi pada paru dan menjadi mediator terjadinya inflamasi sistemik (Abbas *et al.*, 2010).

Pemberian kefir susu sapi sebagai antioksidan, dapat menurunkan ROS dalam tubuh, dengan menghambat pembentukan ROS akibat radikal bebas. Karena ROS yang menurun, maka jumlah sitokin akan menurun dan jumlah leukosit juga akan menurun.

3.2 Hipotesis Penelitian

Pemberian kefir susu sapi dapat menurunkan jumlah leukosit serum darah tikus putih (*Rattus novergicus*) bunting yang dipapar asap rokok.



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

25 ekor hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok, tiap kelompok terdiri dari 5 tikus bunting dengan rancangan penelitian *true* eksperimental menggunakan *Randomized Post Test Only Control Group Design*. Kelompok kontrol negatif (P0) adalah tikus bunting tanpa paparan asap rokok dan tanpa pemberian kefir susu sapi. Kelompok kontrol positif (P1) adalah tikus bunting yang dipapar asap rokok tanpa pemberian kefir susu sapi. Kelompok P2, P3, dan P4 adalah kelompok perlakuan yang dipapar asap rokok dan diberikan kefir susu sapi dengan dosis berbeda per oral, yaitu P2 dengan dosis 2,5 ml/kgBB/hari, P3 dengan dosis 5 ml/kgBB/hari, dan P4 dengan dosis 10 ml/kgBB/hari. Pemberian kefir susu sapi dan pemaparan asap rokok dilakukan pada hari ke-5 sampai hari ke-18 kebuntingan. Pembedahan tikus untuk pengambilan sampel darah dari jantung dilakukan pada hari ke-19. Kemudian dibandingkan efek pemberian kefir susu sapi terhadap jumlah total leukosit serum darah pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

4.2 Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) dan belum pernah melahirkan.

4.2.1 Kriteria Inklusi

- a. Jenis kelamin tikus: betina
- b. Berat badan tikus: 130-160 gram
- c. Umur tikus: 8 minggu – 9 minggu
- d. Sehat ditandai dengan pergerakan yang aktif, mata yang jernih, dan bulu yang tebal berwarna putih.
- e. Bunting : hari ke 1 – hari ke 18

4.2.2 Kriteria Eksklusi

- a. Tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung
- b. Terlalu cepat melahirkan (keguguran dan prematur)

4.3 Besar Sampel dan Replikasi

Jumlah replikasi (n) pada setiap perlakuan (p) dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut (Solimun, 2001) dengan $p=5$:

$$p(n-1) \geq 15$$

$$pn - p \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Dari perhitungan didapatkan $n \geq 4$, jadi dilakukan minimal 4 kali replikasi untuk masing-masing kelompok. Karena adanya kemungkinan akan *drop-out*, maka dalam penelitian ini digunakan 5 ekor tikus bunting sebagai sampel untuk masing-masing kelompok sehingga besar sampel secara keseluruhan adalah 25 ekor.

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan dan perlakuan terhadap tikus berupa paparan asap rokok serta pemberian kefir susu sapi dilakukan di laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Analisa jumlah total leukosit serum darah tikus dilakukan di laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

- a. Paparan asap rokok
- b. Pemberian kefir susu sapi dalam 3 dosis

4.5.2 Variabel Tergantung

Jumlah total leukosit serum darah tikus putih hari ke-20 kebuntingan.

4.6 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional	Satuan	Skala
1.	Tikus bunting	Tikus bunting adalah tikus betina yang telah dikawinkan dengan tikus jantan dan memperlihatkan tanda-tanda kebuntingan yakni terdapat sumbat vagina (<i>vaginal plaque</i>) (Malole dan Pramono, 1998). Pada tikus bunting, fetus dapat dipalpasi pada hari ke-10	ekor	-

		kebuntingan, tetapi palpasi akan lebih akurat dilakukan pada hari ke-12 kebuntingan. Pembesaran abdomen terlihat pada hari ke-13 kebuntingan (Suckow <i>et al.</i> , 2006). Usia kebuntingan dihitung sebagai hari ke-1 pada saat muncul sumbat vagina sampai hari ke-18.		
2.	Asap rokok	Pemaparan asap rokok dimulai pada hari ke-5 kebuntingan selama 14 hari menggunakan rokok kretek yang dipaparkan selama 7,5 menit per hari menggunakan alat <i>smocking pump</i> milik Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.	batang/hari	rasio
3.	Kefir susu sapi	Kefir susu sapi yang digunakan adalah produk jadi yang diperoleh dari iBiKK Susu Fementasi Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Kota Malang. Kefir susu sapi tersebut terdiri dari susu sapi yang ditambahkan bibit kefir. Penggunaan kefir susu sapi tersebut diganti setiap lima hari sekali karena adanya perbedaan kandungan	ml/kgBB/hari	rasio

		jumlah total bakteri pada hari ke-5 (BPKI, 2017). Kefir susu sapi diberikan peroral yang dibantu oleh petugas laboratorium pada dengan pengelompokan dosis sesuai rancangan penelitian yaitu: 2,5 ml/kg BB/hari. 5 ml/kg BB/hari, 10 ml/kg BB/hari.		
4.	Jumlah leukosit	Jumlah total leukosit dalam darah perifer dengan satuan $10^3/\mu\text{L}$ yang diperiksa dengan alat ABX Micros 60 (<i>Hematology Analyzer</i>).	$10^3/\mu\text{L}$	rasio

4.7 Bahan dan Alat Penelitian

4.7.1 Bahan Penelitian

a. Bahan pemeliharaan hewan coba tikus

Makanan hewan coba adalah makanan ternak pakan:tepung= 2:1 dan minuman hewan coba adalah air mineral.

b. Bahan perlakuan hewan coba tikus

1. Rokok

Asap rokok yang dipaparkan berasal dari rokok kretek.

2. Kefir Susu Sapi

Kefir susu sapi yang tersedia di pasaran kota Malang.

c. Bahan untuk pemeriksaan jumlah leukosit

Serum darah dari masing-masing induk tikus dan uji reagen



Untuk pemaparan asap rokok pada hewan coba, alat yang digunakan adalah *smoking pump* buatan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Prosedur pemakaian *smoking pump* dengan cara memasukkan tikus ke dalam box tikus yang dibuat dari fiberglass berukuran 43 x 35 x 13 cm³ dan akan dihubungkan dengan saluran yang menghasilkan asap rokok. Satu batang rokok kretek dipasang pada selang. Saklar dinyalakan sambil membakar rokok dibantu dengan klem untuk menjepit selang penyalur asap rokok agar menghasilkan asap rokok yang maksimal.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Aklimatisasi Hewan Coba

Aklimatisasi hewan coba dilakukan selama tujuh hari terhadap kondisi air, makanan dan suhu di dalam laboratorium.

4.8.2 Prosedur Pembuntingan Hewan Coba

Waktu kawin tikus dilakukan pada fase estrus (birahi) yang ditandai dengan telinga bergerak-gerak saat kepala atau punggung dibelai, sikap lordosis ketika panggul di stimulasi, penerimaan tikus jantan oleh tikus betina untuk kopulasi dan dinding vagina yang terlihat kering serta vulva yang bengkak. Fase ini berlangsung kira-kira 9 sampai 15 jam dan biasanya lebih sering terjadi pada malam hari daripada siang hari (Suckow *et al.*, 2006). Jika telah timbul tanda estrus, maka tikus betina dikawinkan dengan tikus jantan. Pengawinan dilakukan dengan mencampurkan hewan jantan dan betina dengan perbandingan 1:2. Tikus jantan dimasukkan ke kandang tikus betina pada pukul 16.00 WIB dimana

sekam pada kandang betina diganti. Keesokan harinya pada pukul 05.00 WIB dilakukan pengecekan, apabila ditemukan *vaginal plaque*, maka hari tersebut dihitung sebagai hari pertama kebuntingan. Namun, *vaginal plaque* bukan merupakan tanda pasti dari kebuntingan tikus, melainkan hanya merupakan tanda bahwa telah terjadinya kopulasi. Tikus yang telah bunting diberi label (*permanent board marker*) pada ekor kemudian dimasukkan ke dalam kelompok yang telah ditentukan dan selanjutnya akan mendapat perlakuan, sedangkan yang belum bunting dicampur kembali dengan tikus jantan.

4.8.3 Pembagian Kelompok Hewan Coba

Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok, 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan yang masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus dengan rincian sebagai berikut:

1. Kelompok kontrol:
 - a. Negatif: tanpa dipapar asap rokok, tanpa diberi kefir susu sapi
 - b. Positif: dipapar asap rokok, tanpa diberi kefir susu sapi
2. Kelompok perlakuan:
 - a. Perlakuan 1: dipapar asap rokok diberi kefir susu sapi dosis 2,5 ml/kgBB/hari
 - b. Perlakuan 2: dipapar asap rokok diberi kefir susu sapi dosis 5 ml/kgBB/hari
 - c. Perlakuan 3: dipapar asap rokok diberi kefir susu sapi dosis 10 ml/kgBB/hari

4.8.4 Penentuan Dosis Kefir Susu Sapi

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Fahmy dan Amel (2015) yang meneliti tentang efek kefir susu sapi yang telah terbukti bahwa kandungan dalam susu kefir merupakan antioksidan alami dan mampu menangkap radikal bebas sehingga dapat memelihara kadar MDA, GSH (*glutathione*) dan aktivitas GSH-Px (*glutathione peroxidase*) mendekati keadaan normal yang mengatur aktivitas MMP-2 (matriks metalloproteinase-2) dan MMP-9 (matriks metalloproteinase-9) sehingga mampu melindungi DNA dari kerusakan oksidatif dengan pemberian dosis kefir susu sapi sebesar 5ml/kgBB/hari. Oleh karena itu, peneliti menggunakan dosis 2,5 ml/kgBB/hari ; 5 ml/kgBB/hari ; 10 ml/kgBB/hari (Fahmy *et al.*, 2015). Perhitungan kebutuhan kefir susu sapi berdasarkan berat badan tikus adalah sebagai berikut.

Dosis 1:

Berat badan tikus = 150 gram

Dosis kefir susu sapi = 2,5 ml/kgBB/hari

$$\begin{aligned} \text{Kebutuhan kefir susu sapi} &= \frac{150}{1000} \times 2,5 \text{ ml/kgBB/hari} \\ &= 0,375 \text{ ml} \end{aligned}$$

Dosis 2:

Berat badan tikus = 150 gram

Dosis kefir susu sapi = 5 ml/kgBB/hari

$$\begin{aligned} \text{Kebutuhan kefir susu sapi} &= \frac{150}{1000} \times 5 \text{ ml/kgBB/hari} \\ &= 0,75 \text{ ml} \end{aligned}$$

Dosis 3:

$$\begin{aligned}\text{Berat badan tikus} &= 150 \text{ gram} \\ \text{Dosis kefir susu sapi} &= 10 \text{ ml/kgBB/hari} \\ \text{Kebutuhan kefir susu sapi} &= \frac{150}{1000} \times 10 \text{ ml/kgBB/hari} \\ &= 1,5 \text{ ml}\end{aligned}$$

4.8.5 Prosedur Pemeliharaan Hewan Coba

Hewan coba dipelihara dan diadaptasikan dalam laboratorium selama satu minggu dengan suhu ruangan konstan. Untuk tempat pemeliharaan digunakan kotak plastik berukuran 43 x 35 x 13 cm, masing-masing untuk 5 ekor tikus, ditutup dengan kawat kasa dan diberi alas sekam yang diganti dalam 2x/minggu. Porsi makanan tikus adalah 40 g/hari/ekor.

4.8.6 Prosedur Pemberian Kefir Susu Sapi pada Hewan Coba

Kefir susu sapi diberikan mulai hari ke-5 sampai hari ke-18 kebuntingan secara oral dengan sonde.

4.8.7 Prosedur Pemaparan Asap Rokok pada Hewan Coba

Pemaparan asap rokok dilakukan pada hari ke-1 hingga hari ke-18 kebuntingan. Prosedur pemaparan asap rokok pada tikus adalah sebagai berikut (standar pemaparan asap rokok laboratorium Farmakologi FKUB):

- Tikus ditimbang berat badannya dengan neraca *Ohaus* sebelum dipapar asap rokok.
- Tempat pemaparan dibersihkan dari kotoran dan sisa asap.

- c. Nikotin yang melekat di *smoking pump* dibersihkan terlebih dahulu.
- d. Power dan *self voltage* diperiksa.
- e. Rokok dipasang pada pipa sampai batas merah.
- f. Tiga ekor dimasukkan kedalam kotak dan segera ditutup, karena pada *smoking pump* hanya tersedia tiga ruangan.
- g. Setiap pemaparan asap rokok dilakukan dengan menjalankan pompa selama 7,5 menit untuk 1 batang rokok, kemudian alat dimatikan, tutup dibuka dan selanjutnya tikus segera dipindahkan ke kandang semula.
- h. Setiap pemaparan berikutnya kotak selalu dibersihkan dahulu dari sisa asap rokok perlakuan sebelumnya.
- i. Pompa tetap dijalankan tanpa rokok untuk mengeluarkan sisa asap.
- j. Tahap-tahap di atas diulangi untuk kelompok tikus berikutnya.

4.8.8 Prosedur Pembedahan dan Pengambilan Leukosit Serum Darah

Pada hari ke-19 setelah diberi perlakuan, tikus dibedah untuk dilakukan pengukuran jumlah leukosit. Pada proses pembedahan, tikus sebelumnya dimatikan terlebih dahulu dengan injeksi ketamin 0,1-0,2 cc pada pahanya secara IM dan ditunggu sampai tidak bergerak tetapi jantung masih berdenyut. Kemudian tikus dibedah dan pengambilan sampel dilakukan dengan mengambil serum darahnya dari jantung. Kemudian sampel darah tersebut dipindahkan ke dalam tabung hampa udara (*vacutainer tube*) berisi EDTA kemudian dikirim ke Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk dilakukan pemeriksaan darah lengkap. Selanjutnya bangkai induk dan anak tikus yang sudah tidak digunakan dikubur dengan aman oleh petugas laboratorium.

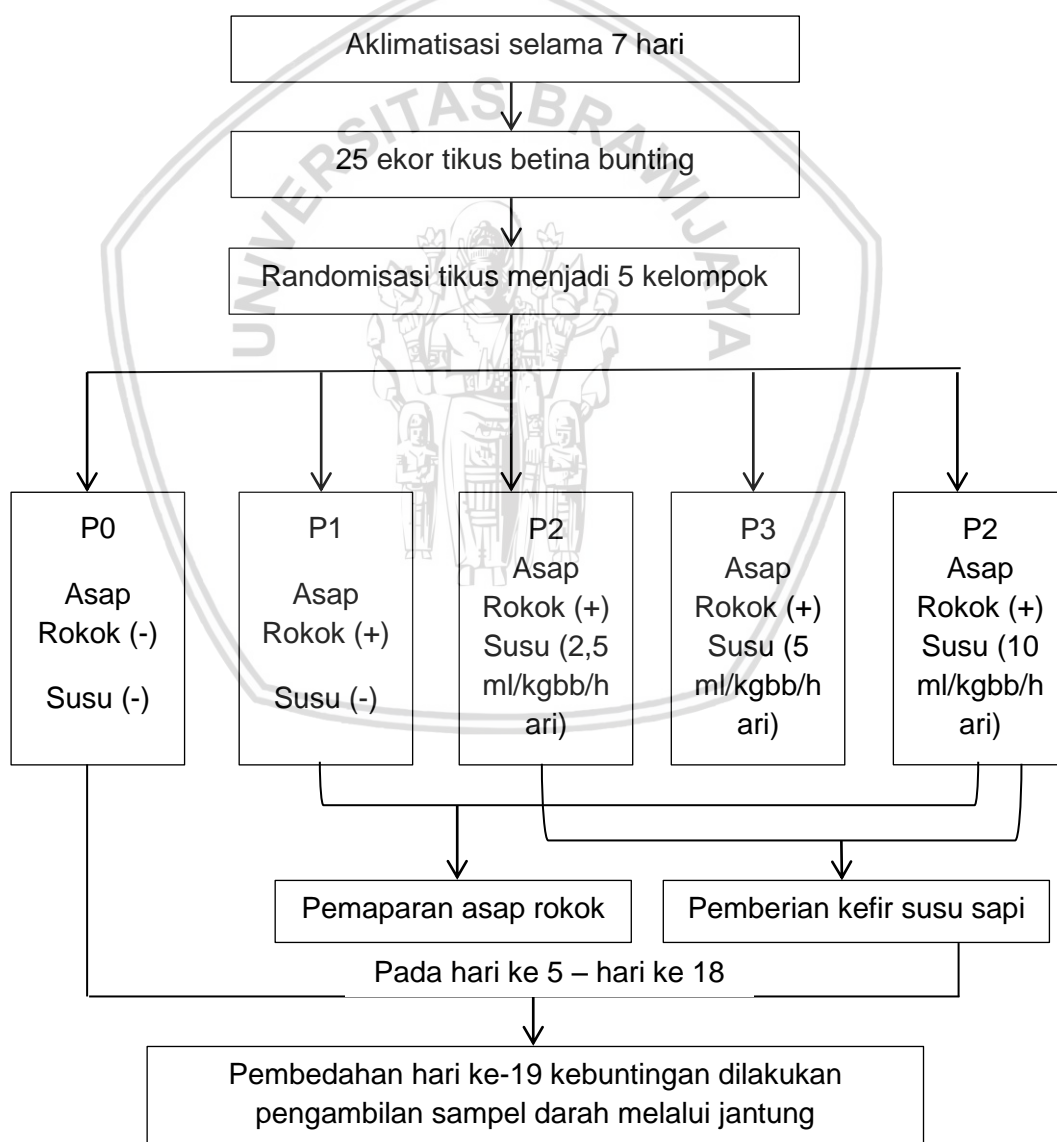
4.8.9 Prosedur Pengukuran Jumlah Leukosit Serum Darah

Teknik pemeriksaan dan perhitungan jumlah leukosit, dengan cara mengambil darah sebanyak 2 ml ditambahkan EDTA ditempatkan dalam tabung steril. Sampel darah diperiksa dengan alat ABX Micros 60 (*Hematology Analyzer*) dengan langkah-langkah sebagai berikut (ABX Micros 60 *User Manual*):

1. Prinsip penggunaan alat berdasarkan spesifikasi ukuran sel yang melewati filter dengan memakai tegangan listrik untuk sekali pembacaan bisa diperiksa sekaligus beberapa parameter seperti Hb, Ht, leukosit, trombosit, eritrosit, MCH, MCHC, dan MCV.
2. Cara kerja menggunakan alat ABX Micros 60, dengan menyalakan *switch* utama, terletak di belakang instrumen.
3. Setelah lampu indikator menyala, tekan tombol *start up*, maka secara otomatis alat akan melakukan pembilasan dan melakukan pemeriksaan reagen. Jika lolos maka alat akan menampilkan nilai nol untuk setiap parameter pemeriksaan dan jika tidak, maka secara otomatis alat akan melakukan pembilasan ulang dan pemeriksaan reagen sampai tiga kali sehingga didapatkan angka nol untuk setiap parameter pemeriksaannya.
4. Tekan tombol *start*.
5. Siapkan bahan pemeriksaan (darah EDTA).
6. Tekan tombol *ID*, tekan tombol *enter* tunggu sampai jarum penghisap darah keluar.
7. Tempelkan alat penghisap sampai dasar tabung kemudian tekan *sampel bar* sampai jarum masuk kembali dan melakukan pemeriksaan.

8. Alat akan memproses *sample* selama satu menit dan hasil pemeriksaan akan tampak pada layar.
9. Untuk mematikan alat, tekan *stand by* maka alat akan mencuci selama satu menit, setelah layar padam matikan alat dengan menekan *switch* utama yang terletak di bagian belakang.

4.9 Alur Penelitian



4.10 Analisis Data

Hasil pengukuran jumlah total leukosit serum darah tikus antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dianalisa secara statistik menggunakan program SPSS 20 dengan signifikansi sebesar 0,005 ($p=0,005$) dan taraf kepercayaan sebesar 95% ($\alpha=0,05$). Berikut merupakan langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif.

1. Uji normalitas data: uji ini bertujuan untuk mengetahui apakah data bersifat normal atau tidak. Hal ini dikarenakan pemilihan data dan uji hipotesis tergantung pada normal atau tidaknya distribusi data. Jika data terdistribusi normal maka menggunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Namun, jika data terdistribusi secara tidak normal maka menggunakan median dan minimum-maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran pada penyajian data. Untuk uji hipotesis, jika sebaran data normal maka menggunakan uji parametrik. Sedangkan jika sebaran data tidak normal maka menggunakan uji non parametrik.
2. Uji homogenitas varian: uji ini bertujuan untuk menguji Anova berlaku atau tidak, yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen atau tidak. Jika varian homogen, maka Anova dapat digunakan.
3. Uji *One Way ANOVA* (analisa varian satu arah): uji ini bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui terhadap minimal dua kelompok yang berbeda signifikan.
4. *Pos Hoc Test* (uji Tukey-HSD): uji ini bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil uji tes Anova.

Uji *post hoc* yang digunakan adalah uji Tukey dengan tingkat kemaknaan 95% ($p < 0,05$).

5. Uji Korelasi *Pearson*: untuk mengukur kekuatan hubungan dua variabel atau lebih yang berskala interval (parametrik). Pada uji korelasi *Pearson*, bila didapatkan:

1. Sig. (p) $> 0,05$: tidak ada korelasi antara dua variabel.

Sig. (p) $< 0,05$: ada korelasi antara dua variabel.

2. Kekuatan korelasi $> 0,5$: korelasi yang cukup kuat.

Kekuatan korelasi $< 0,5$: korelasi yang lemah.

3. Arah korelasi positif (+): searah. Semakin besar nilai suatu variabel, semakin besar pula nilai variabel lainnya.

Arah korelasi negatif (-): berlawanan arah. Semakin besar nilai suatu variabel, semakin kecil nilai variabel lainnya.

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

1.1 Hasil Penelitian

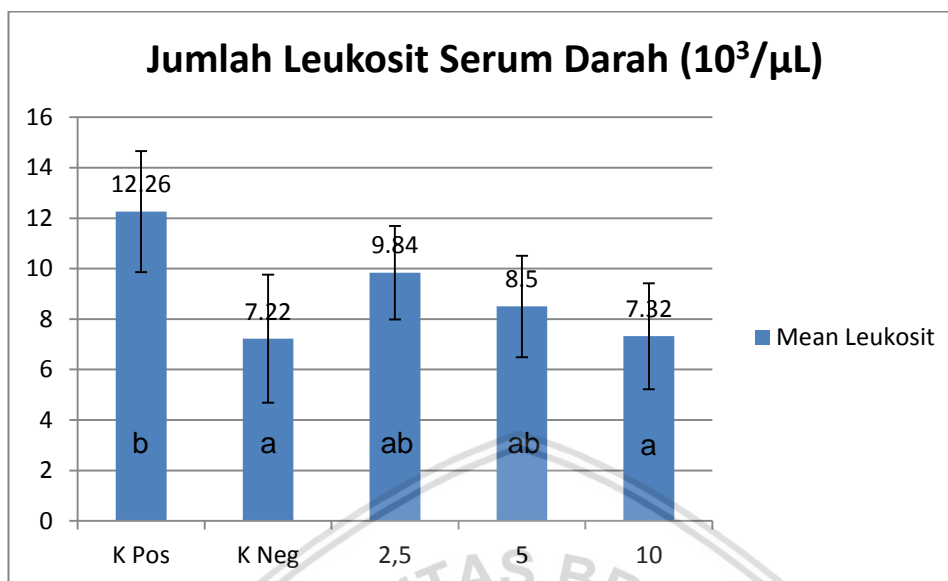
Hasil pengukuran rata-rata jumlah leukosit serum darah tikus (*Rattus novergicus*) pada kelompok kontrol negatif, kontrol positif dan kelompok perlakuan dengan 3 dosis berbeda disajikan ke dalam **Tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Hasil Pengukuran Jumlah Leukosit Serum Darah Tikus Setelah Dipapar Asap Rokok dan Diberikan Kefir Susu Sapi Berbagai Dosis

Kelompok	Rata-Rata Leukosit \pm Leukosit ($10^3/\mu\text{L}$)
Kontrol (-)	7,22 \pm 2,53
Kontrol(+)	12,26 \pm 2,39
P 1	9,84 \pm 1,85
P 2	8,5 \pm 2,00
P 3	7,32 \pm 2,09

Keterangan :

- Kontrol negatif : tanpa dipapar asap rokok dan tanpa pemberian kefir susu sapi
- Kontrol positif : paparan asap rokok tanpa pemberian kefir susu sapi
- Perlakuan 1 : paparan asap rokok dan diberi kefir susu sapi dosis 2,5 ml/kgBB dimulai hari ke 5 kebuntingan sampai hari ke 18 kebuntingan.
- Perlakuan 2 : paparan asap rokok dan diberi kefir susu sapi dosis 5 ml/kgBB dimulai hari ke 5 kebuntingan sampai hari ke 18 kebuntingan.
- Perlakuan 3 : paparan asap rokok dan diberi kefir susu sapi dosis 10 ml/kgBB dimulai hari ke 5 kebuntingan sampai hari ke 18 kebuntingan



Gambar 5.1 Grafik Rata-Rata Jumlah Leukosit Serum Darah Tikus

Keterangan : Rata-rata jumlah leukosit serum darah tikus setelah diberikan paparan asap rokok dan pemberian kefir susu sapi ($10^3/\mu\text{L}$)

Pengukuran leukosit menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol negatif (-) didapatkan jumlah leukosit serum darah paling rendah ($7,22 \times 10^3/\mu\text{L}$). Sedangkan pada kelompok kontrol positif (+) didapatkan jumlah leukosit serum darah tikus paling tinggi ($12,26 \times 10^3/\mu\text{L}$) yang lebih tinggi dari kadar normal leukosit. Pada kelompok perlakuan didapatkan jumlah leukosit serum darah yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Kelompok perlakuan 1 memperlihatkan jumlah leukosit serum darah tertinggi ($9,84 \times 10^3/\mu\text{L}$). Diikuti kelompok perlakuan 2 ($8,5 \times 10^3/\mu\text{L}$) dan terendah pada perlakuan 3 ($7,32 \times 10^3/\mu\text{L}$). Semakin tinggi dosis kefir susu sapi yang diberikan, didapatkan hasil rata-rata jumlah leukosit serum darah yang semakin rendah.

5.2 Analisis Data

Analisa data yang digunakan terhadap jumlah leukosit serum darah tikus tiap kelompok adalah dengan uji *One-way Anova* karena data yang digunakan lebih dari 2 kelompok data dan tidak berpasangan. Sebelum dilakukan uji *One-way Anova* dilakukan terlebih dahulu uji normalitas dan homogenitas data yang merupakan syarat dari dapat digunakan uji *One-way Anova* pada kelompok. Sebaran data yang normal diketahui dengan uji normalitas data (Uji *Saphiro-Wilk*). Sedangkan varian data yang sama dapat diketahui dengan uji homogenitas varian. Adapun uji normalitas data (lampiran 7) didapatkan bahwa data dari semua kelompok memiliki sebaran normal (uji *Saphiro-Wilk*, $p > 0,05$). Sedangkan uji homogenitas varian menghasilkan data dengan varian yang sama ($p > 0,05$) dengan nilai $p = 0,829$. Berdasarkan hal tersebut maka uji *One-way Anova* dapat digunakan pada analisa data.

Berdasarkan hasil pengujian *One-way Anova* (lampiran 7) diperoleh nilai $p = 0.009$ ($p < 0,05$). Dengan demikian hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan jumlah leukosit serum darah minimal antara dua kelompok berbeda. Selanjutnya untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan, maka dilakukan uji Post Hoc dari hasil uji *One-way Anova*, yaitu uji *Tukey-HSD*.

Tabel 5.2 Hasil Uji Tukey-HSD

<i>p-value</i>	K(-)	K(+)	P1	P2	P3
K(-)		0,013*	0,355	0,885	1,000
K(+)			0,431	0,088	0,015*
P1				0,867	0,392
P2					0,911
P3					

p-value < 0,05 adalah bermakna (*)

Berdasarkan **tabel 5.2** yang merupakan hasil dari uji *Tukey HSD* didapatkan bahwa kelompok yang dipapar asap rokok saja tanpa diberi kefir susu sapi (kontrol positif) memiliki jumlah leukosit serum darah yang lebih tinggi secara bermakna dibanding kelompok yang tidak dipapar asap rokok (kontrol negatif) ($p = 0,013$) ($p < 0,05$). Kelompok perlakuan 3 jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif menunjukkan jumlah leukosit serum darah yang lebih rendah secara signifikan ($p = 0,015$) ($p < 0,05$).

Untuk mengetahui kekuatan hubungan antara dosis kefir susu sapi dengan jumlah leukosit serum darah, maka dilakukan uji korelasi *Pearson*. Dari hasil perhitungan statistika menggunakan korelasi *Pearson* (lampiran 9) didapatkan hasil korelasi = (-0.669) menunjukkan hubungan yang sangat kuat antara pemberian kefir susu sapi dengan penurunan jumlah leukosit serum darah secara signifikan ($p = 0.001$) ($p < 0,05$). Arah korelasi bernilai negatif, artinya semakin tinggi dosis kefir susu sapi yang diberikan maka semakin rendah kadar jumlah leukosit serum darah. Sedangkan untuk mengetahui persentase jumlah leukosit serum darah yang dipengaruhi oleh kefir susu sapi, maka digunakan uji

regresi. Berdasarkan uji statistika menggunakan regresi linear, didapatkan hasil (r^2) = 0.489 yang menunjukkan bahwa kefir susu sapi berpengaruh terhadap jumlah leukosit serum darah sebesar 48,9%.



BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian kefir susu sapi terhadap peningkatan atau penurunan jumlah leukosit serum darah tikus bunting akibat pemaparan asap rokok. Asap rokok akan menginduksi tubuh untuk memproduksi radikal bebas yang dapat mengakibatkan terjadinya stress oksidatif ditandai dengan meningkatnya radikal oksigen dan reaksi inflamasi berupa peningkatan jumlah leukosit. Pemberian kefir susu sapi pada tikus bunting yang dipapar asap rokok digunakan untuk mengetahui efek proteksi antioksidan dalam kefir susu sapi terhadap radikal bebas dalam asap rokok.

Asap rokok terdiri dari bahan kimia berbahaya yang meningkatkan radikal bebas di dalam tubuh. Peningkatan radikal bebas akibat asap rokok dihubungkan dengan peningkatan jumlah sitokin dalam tubuh seperti Interleukin 8 (IL-8), Interleukin (IL-6), IL-1 β , dan *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF). Sitokin tersebut yang bertanggung jawab terhadap stimulasi sumsum tulang dan menjadi mediator terjadinya inflamasi sistemik. IL-6 adalah mediator penting respon fase akut dan berpotensi menstimulasi sumsum tulang untuk mengeluarkan leukosit dan platelet (Suwa *et al.*, 2000).

IL-8 merupakan sitokin yang berperan terhadap leukositosis pada paparan asap rokok. IL-8 diproduksi oleh sel leukosit dan non-leukosit. Diantara sel tersebut, neutrofil memproduksi IL-8 dalam jumlah yang sangat kecil, namun saat terstimulasi nikotin yang terkandung dalam asap rokok neutrofil

memproduksi IL-8 dalam jumlah yang besar (Cunningham, 2013). Nikotin menginduksi *reactive oxidative intermediate's* (ROIs), terutama ONOO⁻ yang menjadi inisiator aktivasi NF- κ B melalui peningkatan degradasi I κ B sehingga produksi IL-8 meningkat pada leukosit dan merupakan penyebab leukositosis (Komala, 2011).

Kehamilan merupakan keadaan fisiologis yang disertai dengan peningkatan jumlah leukosit yang melebihi kadar normal di dalam darah. Di masa kehamilan, sebagai kompensasi mengandung janin terjadi peningkatan fisiologis dari leukosit. Efek ini terjadi akibat toleransi ibu terhadap antigen jaringan asing dari janin yang bersifat semialogenik (genetik 50% dari paternal dan 50% dari maternal sehingga janin akan mempresentasikan antigen yang terdapat pada paternal dan maternal). Namun, jika jumlah sel darah putih lebih dari 12.000/mm³ merupakan indikasi adanya leukositosis pada wanita hamil. Tingginya jumlah leukosit berakibat buruk pada kehamilan dan janin, seperti persalinan prematur, Infeksi Neonatal Awitan Dini (INAD), dan lain-lain (Ross, 2011).

Dari hasil pengukuran jumlah leukosit serum darah pada kelompok kontrol positif (+) menunjukkan peningkatan jumlah leukosit serum darah secara signifikan yang diberi paparan asap rokok sejak kebuntingan hari ke 5 hingga hari ke 18.

Radikal bebas dalam asap rokok akan menghasilkan ROS berlebih, yang merupakan oksidan utama dalam tubuh. Ketika ROS berlebih, antioksidan dalam tubuh akan menurun dan terjadi ketidakseimbangan akibat tingginya kadar oksidan yang tidak dapat dikompensasi oleh tubuh. Ketika radikal bebas berlebih yang disertai dengan penurunan antioksidan maka akan terjadi stress oksidatif. Pada kondisi normal, ROS akan ditanggulangi oleh antioksidan dalam tubuh

seperti SOD (*Superoxide Dismutase*), katalase, GSH (*Glutathione Peroxidase*), atau dapat dibantu dengan antioksidan luar (Mazzone *et al.*, 2010).

Pada kelompok dengan pemaparan asap rokok serta pemberian kefir susu sapi dengan dosis 2,5 ml/kgBB/hari, didapatkan rata-rata leukosit serum darah sebesar $9,84 \times 10^3/\mu\text{L}$. Hal ini menunjukkan bahwa dengan dosis 2,5 ml/kgBB/hari hasil rata-rata leukosit serum darah menjadi lebih rendah daripada kelompok yang hanya diberi paparan asap rokok saja (kontrol positif). Namun demikian jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif belum terdapat perbedaan yang bermakna ($p = 0,431$) ($p < 0,05$), dan dosis pada perlakuan 1 belum bisa mengembalikan jumlah leukosit serum darah ke kondisi normal (kontrol negatif).

Hal yang sama terjadi pada kelompok dengan pemaparan asap rokok serta pemberian kefir susu sapi dengan dosis 5ml/kgBB/hari, rata-rata leukosit serum darah sebesar $8,5 \times 10^3/\mu\text{L}$. Walaupun lebih rendah dibanding kelompok kontrol positif (+) namun secara statistika belum terdapat perbedaan yang bermakna ($p = 0,088$) ($p < 0,05$). Dengan demikian pemberian dosis 5ml/kgBB/hari belum bisa mengembalikan jumlah leukosit serum darah ke kondisi normal (kontrol negatif), sehingga dosis ini belum dapat dikatakan optimal.

Fenomena yang menarik terjadi pada kelompok dengan pemaparan asap rokok serta pemberian kefir susu sapi dengan dosis 10 ml/kgBB/hari, yang memperlihatkan rata-rata leukosit serum darah sebesar $7,32 \times 10^3/\mu\text{L}$. Jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (+) maka terdapat perbedaan rata-rata leukosit serum darah yang lebih rendah secara signifikan ($p = 0,015$) ($p < 0,05$) dan dapat mengembalikan jumlah leukosit serum darah ke kondisi normal

(kontrol negatif). Jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1 tidak terdapat perbedaan jumlah leukosit serum darah secara signifikan ($p = 0,392$) ($p < 0,05$). Begitu pula dengan kelompok perlakuan 2 tidak terdapat perbedaan jumlah leukosit serum darah secara signifikan ($p = 0,911$) ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa dosis perlakuan 3 merupakan dosis yang optimal dibandingkan dengan dosis perlakuan 1 dan 2 karena dengan menggunakan dosis 10 ml/kgBB/hari sudah dapat memberikan hasil jumlah leukosit serum darah kembali normal (kontrol negatif). Sehingga dapat dikatakan bahwa dosis 10 ml/kgBB/hari merupakan dosis yang lebih efisien dalam menghasilkan jumlah leukosit serum darah yang lebih rendah.

Berdasarkan hasil rata-rata jumlah leukosit serum darah, didapatkan bahwa dengan pemberian dosis 10 ml/kgBB/hari sudah dapat menghasilkan jumlah leukosit serum darah yang lebih rendah pada kondisi normal. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Wong dan Kitts (2003) yang menyebutkan bahwa protein dalam kefir susu sapi berpotensi sebagai antioksidan. Kefir telah terbukti memiliki kemampuan antioksidan yang sama dengan vitamin E dalam mencegah kerusakan oksidatif akibat CCl_4 (karbon tetraklorida) pada hewan percobaan yang mana aktivitas antioksidan kefir lebih efektif dibandingkan vitamin E.

Penelitian lainnya yang dilakukan oleh Judiono *et al.* (2011) menunjukkan bahwa pemberian susu kefir secara signifikan meningkatkan kapasitas antioksidan dalam tubuh. Aktivitas antioksidan dalam kefir secara tidak langsung melalui mekanisme menghambat oksidasi, mengurangi radikal hidroksil, superoksida dan peroksida. Aktivitas antioksidan akan memberikan atom hidrogen dari NADP (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*) yang nantinya akan mengurangi keberadaan radikal bebas.

Efek antioksidan susu kefir secara langsung melalui beberapa mekanisme dapat menurunkan jumlah leukosit serum darah. Dengan demikian berdasarkan kajian-kajian teoritik dan statistik di atas maka hipotesa penelitian yang menyebutkan bahwa pemberian kefir susu sapi dapat menurunkan jumlah leukosit serum darah tikus putih (*Rattus novergicus*) bunting yang dipapar asap rokok terbukti.

Penurunan jumlah leukosit serum darah tidak hanya dipengaruhi oleh pemberian kefir susu sapi (eksogen). Melalui uji regresi didapatkan 48,9% penurunan jumlah leukosit serum darah dipengaruhi oleh pemberian kefir susu sapi (eksogen). Sedangkan sisanya dapat dipengaruhi oleh faktor lain seperti adanya aktivitas proteksi antioksidan dari dalam tubuh seperti SOD, katalase, glutathion peroksida (GSH), serta protein glutathion. Hasil korelasi dengan nilai sebesar (-0,669) menunjukkan hubungan yang sangat kuat antara pemberian kefir susu sapi dengan jumlah leukosit serum darah. Sehingga dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi dosis kefir susu sapi yang diberikan maka jumlah leukosit serum darah akan semakin rendah.

Keterbatasan dari penelitian ini adalah proses pengawinan tikus menggunakan tanda *vaginal plaque* sebagai salah satu tanda kebuntingan. Namun, tanda ini tidak menjamin tikus akan 100% mengalami kebuntingan. Oleh karena itu, diperlukan replikasi sampel lebih banyak untuk menyiasati ketidakpastian kebuntingan hewan coba. Selain itu, peneliti tidak dapat mengendalikan faktor-faktor yang dapat mempengaruhi hasil penelitian seperti perubahan kandungan kefir susu sapi dari hari ke hari.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Adanya pengaruh pemberian kefir susu sapi terhadap jumlah leukosit serum darah tikus putih yang dipapar asap rokok yaitu pemberian kefir susu sapi dapat menurunkan jumlah leukosit serum darah tikus putih yang dipapar asap rokok.

1. Rata-rata jumlah leukosit pada serum darah tikus putih yang dipapar asap rokok memiliki kadar leukosit yang tinggi hingga mencapai leukositosis yaitu $12,26 \times 10^3/\mu\text{L}$.
2. Rata-rata jumlah leukosit pada serum darah tikus putih yang dipapar asap rokok dan diberi kefir susu sapi kelompok P1, P2, P3 berturut-turut yaitu sebesar $9,84 \times 10^3/\mu\text{L}$, $8,5 \times 10^3/\mu\text{L}$, dan $7,32 \times 10^3/\mu\text{L}$.
3. Kadar kefir susu sapi yang dapat memberikan efek optimal terhadap penurunan leukosit pada serum darah tikus putih yang dipapar asap rokok yaitu 10 ml/kgBB/hari.

7.2 Saran

Mengingat adanya keterbatasan dan kekurangan dalam penelitian ini, maka saran yang dapat diberikan adalah :

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan pemberian dosis kefir susu sapi yang berbeda dengan rentang dosis yang lebih kecil dari dosis 1 yaitu 2,5 ml/kgBB/hari untuk mengetahui berapa dosis yang mulai memberikan efek terhadap penurunan leukosit serum darah.
2. Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan penambahan kelompok yang hanya diberikan kefir susu sapi saja tanpa pemaparan asap rokok untuk mengetahui pengaruh kefir susu sapi terhadap leukosit serum darah.



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai S. 2010. *Celullar and Molecular Immunology*, ed. 6. Philadelphia: W.B Saunders Company.
- Anggraini, Herlisa. 2011. *Pengaruh Pemberian Jus Mengkudu (Morinda citifolia L) terhadap Nitric Oxide (NO) dan Reactive Oxygen Intermediate (ROI) Makrofag Tikus yang Terpapar Asap Rokok*. Tesis. Semarang: Program Pascasarjana Magister Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro.
- AVMA. 2013. *Guidelines for the Euthanasia of Animals*. Schaumburg: American Veterinary Medical Association.
- Balai Penelitian dan Konsultasi Industri Laboratorium. 2017. *Report Certificate of Analisis*. Surabaya: BPKI.
- Brounwald, E., Gibson C.M. Relationship Between Baseline White Blood Cell Count and Degree of Coronary Artery Disease and Mortality in Patients with Acute Coronary Syndromes: a TATICS-TIMI 18 substudy. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 40: 1761-8.
- Buckle, K.A., Edwards, R.A., Fleet G.H., Wootton, R. 2010. *Ilmu Pangan*. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia (UI Press).
- Corwin, Elizabeth J. 2008. *Buku Saku Patofisiologi*, ed. 3. Jakarta: EGC.
- Cunningham. 2013. *Obstetri Williams*. Jakarta: EGC
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2009. *Dampak Pencemaran Asap Rokok Terhadap Lingkungan*. <http://www.depkes.go.id>, diakses 1 Desember 2016.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2011. *Rokok Membunuh Lima Juta Orang Setiap Tahun*. <http://www.depkes.go.id/index.php/berita/press-release/458-rokok-membunuh-lima-juta-orang-setiap-tahun.html>, diakses 3 Desember 2016.
- Dinauer M.C., Lekstrom J.A., Dale D.C. Inherited Neutrophil Disorders: Molecular Basis and New Therapies. *Hematology*, 2000, 303-318.
- Dwijoseputro, D. 2005. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Djambatan
- Effendi, Z. 2003. *Peranan Leukosit Sebagai Anti Inflamasi Alergik dalam Tubuh*. Sumatera Utara: Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.
- Fahmy, Amel F.M., Ismail. Gastroprotective Effect of Kefir on Ulcer Induced in Irradiated Rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2015, 144: 85-93.

- Farnworth, Edward .R. 2005. *Kefir – a Complex Probiotic*. Canada: Food Science and Technology Bulletin.
- Feldman, R.S. 2012. *Pengantar Psikologi: Understanding Psychology*, ed. 10. Jakarta: Salemba Humanika.
- GATS. 2011. *Global Adults Tobacco Survey Indonesia Report 2011*. New Delhi: WHO Regional Office For South-East Asia.
- Guyen A., and M. Gulmez. The Effect of Kefir on the Activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO Levels in Carbon Tetrachloride-Induced Mice Tissues. *J. Veterinary Medicine*, 2003, B 50: 412-416.
- Guyon, A.C. 2003. *Fisiologi Manusia dan Mekanismenya terhadap Penyakit*. Jakarta: EGC.
- Guyton, A.C., John E.H. 2007. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*, ed. 11. Jakarta: EGC.
- Hayatin, Dwi. 2007. *Konsumsi Pakan dan Pertambahan Bobot Badan Harian Tikus (Rattus Novergicus) Bunting Akibat Penyuntikan Bst (Bovine Somatotropin)*. Skripsi. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
- Hedrich H.J. 2006. Taxonomy and Stock and Strains. *J.Lab Rat*. 71-92.
- Hidayat, Nur, Padaga, Masdiana C.,Suhartini, Sri. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Yogyakarta: Penerbit ANDI.
- Hoffbrand, J.E., Petit P.A.H. 2005. *Kapita Selekt Hematologi*, ed. 4. Jakarta: EGC.
- Hubrecht, R., Kirkwood, J. 2010. *The UFAW Handbook on The Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*, ed. 8. UK: Wiley-Blackwell, 312-313.
- Hui YH., Lisbeth MG., Ase SH., Jytte J., Wai KN., Peggy SS., et al., 2004. *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Ide, Pangkalan., 2008. *Health Secret of Kefir*. PT Elex media Komputindo, Jakarta.
- Judiono D and Hadisaputro S.Effects of Oral Clear Kefir Probiotics on Glycemic Status, Lipid Peroxidation, Antioxidative Properties of Streptozotocin Induced Hyperglycemia Wistar Rats.*Gizi Indonesia*, 2011, 34(1).
- Keivicius, LA dan Sarkinas A., A Studies on The Growth Conditions and Composition of Kefir Grain as a Food and Forage Biomass. *Diary Sci Abs*, 2004, 66.

- Kiswari, R. 2014. *Hematologi & Transfusi*. Jakarta: Erlangga.
- Komala, P. Setia Rahardja. 2011. *Efek Fluvastatin Terhadap Selisih Jumlah Total Leukosit, Jumlah Neutrofil, dan Alkali Fosfatase Serum pada Tikus Wistar Sebelum dan Sesudah Paparan Asap Rokok*. Tesis. Semarang: Program Pascasarjana Magister Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro.
- Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Yogyakarta. Gajah Mada University Press.
- Krinke, G.J. 2000. *The Handbook of Experimental Animals: The Laboratory Rat*. London. Academic Press.
- Leite, A.M.O., Miguel M.A.L., Peixoto R.S., Rosado A.S., Silva J.T., Paschoalin V.M.S. Microbiological, Technological and Therapeutic Properties of Kefir: a Natural Probiotic Beverage. *Braz. J. Microbiol*, 2013, 44(2).
- Liu, Je-Ruei. Antimutagenic and Antioxidant Properties of Milk-Kefir and Soymilk-Kefir. *J. Agric. Food Chem*, 2005, 53: 2464-2476.
- Liu, JR., Yuh YL., Ming JC., Li JC., Chin WL. Antioxidative Activities of Kefir. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2005, 18 (4): 567-573
- Malole, M.B.M., Pramono C.S.U. 1989. *Penggunaan Hewan-hewan Percobaan di Laboratorium*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Dirjen Pendidikan Tinggi, Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Bogor: IPB Press.
- Mazzone P, William, Mohammed, Vikram, Damir and Luca. Pathophysiological Impact of Cigarette Smoke Toxicity in An Underappreciated Area. *Int. J. Res. Public Health*, 2010, 7: 4111-4128.
- Moriarty, S.E., Shah J.H., Lynn M. Oxidation of Glutathione and Cysteine in Human Plasma Associated with Smoking. *Free Radic Bio Med*, 2003, 35: 1582-8.
- Murray, Robert K., Granner Daryl K., Mayes, Peter A., Rodwell, Victor W. 2003. *Biokimia Harper*, ed. 25. Jakarta: EGC.
- Ngatidjan. 2006. *Metode Laboratorium dalam Toksikologi*. Yogyakarta: FKUGM.
- Nugraha, G. 2015. *Panduan Pemeriksaan Laboratorium Hematologi*. Jakarta: Trans Info Media.
- Otes, Semih, Ozem, Cagindi. Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. *Pakistan Journal Of Nutrition*, 2003, 2(2): 54-59.
- Otles S dan Ozlem Cagindi., Kefir: A Probiotic Dairy-Consumption, Nutritional dan Therapeutic Aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2003, 2(2): 54-59.

- Pardede, R., Metha. 2007. *Perkembangan dan Pertumbuhan Ambing Tikus (Rattus Novergicus) pada Usia Kebuntingan 13, 17, dan 21 Hari Akibat Penyuntikan Bst (Bovine Somatotropin)*. Skripsi. Bogor: Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
- Park, YW dan George FWH., 2013. *Milk and Diary Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health*. Wiley-Blackwell, USA.
- Pazil, S.N.B.T. 2009. *Perbandingan Aktifitas Antioksidan Ekstrak Daging Pisang Raja (Musa AAB 'Pisang Raja') dengan Vitamin A, Vitamin C, dan Katekin Melalui Penghitungan Bilangan Peroksida*. Skripsi. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Pearce, Evelyn C. 2008. *Anatomi dan Fisiologi untuk Paramedis*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Pearson, T.A., Mensah G.A., Alexander R.W., Anderson J.L., Cannon R.O., Criqui, et al. Markers of Inflammation and Cardiovascular disease: Application to Clinical and Public Health Practice: A Statement for Healthcare Professionals from the Center for Disease Control and Prevention and the American Heart Assosiation. *Circulation*, 2003, 107: 499-511.
- Pelczar, Michael J. 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi*, Jilid 1. Jakarta: UI Press.
- Ross, M.H., Pawlina W. 2011. *Histology : A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology*, 6th ed. China: Lippincott Williams & Wilkins.
- Russel, J.C., Towns, D.R., Clout, M.N. 2008. *Review of rat invasion biology. Science & Technical Publishing*. New Zealand: Department of Conservation.
- Samsuria. 2009. *Efek Asap Rokok pada Tikus (Rattus novergicus) Bunting terhadap Tampilan Fisiologis Induk dan Anaknya Setelah Dilahirkan*. Tesis. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Schalm, O.W. 2010. *Schalm's Veterinary Hematology*, ed. 6. UK: Wiley-Blackwell.
- Seydim, GS dan Grene A., Comparison of Amino Acid Profiles of Milk
- Smith, B.J., Mangkoewidjojo S. 1988. *Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Cobaan di Daerah Tropis*. Jakarta: Indonesia Press.
- Smith, C.J., Fischer T.H. Particulate and Vapor Phase Constituents of Cigarette Mainstream Smoke and Risk of Myocardial Infarction. *Atherosclerosis*, 2001, 158(2):67-68.

- Smith, M.R., Kinmonth K.L., Luben R.N. Smoking Status and Differential White Cell Count in Men and Women in the EPIC-Norfolk Population. *Atherosclerosis*, 2003, 7: 133-169.
- Solimun. 2001. *Metode Penelitian Kuantitatif*. Bandung: Penerbit Alfabeta.
- Suckow, M.A., Weisbroth S.H., Franklin, C.L. *The Laboratory Rat*, ed. 2. USA: Elsevier Academic Press.
- Sudono, Adi, Usmiati, Sri. Pengaruh Starter Kombinasi Bakteri dan Khamir Terhadap Sifat Fisikokimia dan Sensori Kefir. *Jurnal Pascapanen*, 2004, Vol. 1, No. 1.
- Suhartono, E., Fachir H., Setiawan B. 2007. *Rokok sebagai Sumber Radikal Bebas dalam Kapita Selekta Biokimia: Stress Oksidatif Dasar dan Penyakit*. Banjarmasin: Pustaka Banua, 117-8.
- Sulaksono, M Edhie. 2002. *Penentuan Nilai Rujukan Parameter Hewan Percobaan sebagai Model Penyakit Manusia dan Hewan*. Jakarta: Litbang Kesehatan.
- Suwa T., Hogg J.C., Englis D., Van Eeden S.F. Interleukin-6 Induced Neutrophilia: Contribution of Bone Marrow Release and Demargination of Intravascular Neutrophils. *AM J Physiol*, 2000, 279: 60-64.
- Staf Pengajar Departemen Farmakologi FK UNSRI. 2004. *Kumpulan Kuliah Farmakologi*, ed.2. Jakarta: EGC.
- Usmiati, S. Kefir Susu Fermentasi dengan Rasa Menyegarkan. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian Bogor*, 2007, 29(2) :12-14.
- Van Eeden, S.F., Yeung A., Quinlam K., Hogg J.C. Systemic Response to Ambient Particulate Matter: Revelance to Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc*, 2005, 2: 7-10.
- Winarsi, Hery. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal: Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Wong P.Y.Y. and Kitts D.D. Chemistry of Buttermilk Solid Antioxidant Activity. *J. Diary Sci*, 2003, 86(2).
- World Health Organization. 2011. *Top 10 Causes of Death*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>, diakses 3 Desember 2016.